



# **SISTEMAS DENDRÍTICOS PARA LA PRESENTACIÓN MULTIVALENTE DE GLICOSAMINOGLICANOS**

**Pedro Domínguez Rodríguez**

Sevilla, 2019





Instituto de Investigaciones  
Químicas



Departamento de  
Química Orgánica



cicCartuja

centro de  
investigaciones científicas  
isla de la cartuja

Centro de Investigaciones Científicas

Isla de la Cartuja

## **SISTEMAS DENDRÍTICOS PARA LA PRESENTACIÓN MULTIVALENTE DE GLICOSAMINOGLICANOS**

Memoria presentada por el  
Licenciado Pedro Domínguez Rodríguez  
para optar al grado de Doctor en Química.

Sevilla, 2019





Dr. Francisco Javier Rojo Marcos Investigador Científico del CSIC y Dr. José Luis de Paz Carrera, Científico Titular del CSIC.

CERTIFICAN que el presente trabajo titulado “SISTEMAS DENDRÍTICOS PARA LA PRESENTACIÓN MULTIVALENTE DE GLICOSAMINOGLICANOS” ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (CSIC – Universidad de Sevilla) constituyendo la Memoria que presenta el Lcdo. Pedro Domínguez Rodríguez para aspirar al título de Doctor en Química.

Sevilla, 2019

Fdo. Francisco Javier Rojo Marcos

Fdo. José Luis de Paz Carrera



El presente trabajo ha sido realizado por el Licenciado Pedro Domínguez Rodríguez con un contrato asociado al Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía (P12 FQM 1303), en el Laboratorio de Glicosistemas del Instituto de Investigaciones Químicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC-Universidad de Sevilla), bajo la dirección de los Drs. Francisco Javier Rojo Marcos y José Luis de Paz Carrera. El trabajo ha sido tutelado por la Profesora Francisca Cabrera Escribano en el marco del Programa de Doctorado en Química.

Fdo.: Pedro Domínguez Rodríguez

Fdo.: Francisco Javier Rojo Marcos  
Director del trabajo

Fdo.: José Luis de Paz Carrera  
Director del trabajo

Fdo.: Francisca Cabrera Escribano  
Tutora del trabajo

Sevilla, 2019



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores José Luis de Paz Carrera y Francisco Javier Rojo Marcos por brindarme la oportunidad de desarrollar mi Tesis Doctoral en su laboratorio y acogerme en su grupo de trabajo. A Javier por sacar lo mejor de mí y darme la autonomía necesaria para poder evolucionar y crecer como científico, mostrándome que el trabajo duro y la constancia son elementos clave para alcanzar los objetivos. Gracias también por abrirme las puertas de tu casa y por esas barbacoas en las que nunca faltaban risas ni Limoncello. Agradecer a José Luis por su mentorización que acompañada de esas charlas, recomendaciones y consejos me han permitido desarrollarme como científico y como persona, consiguiendo hacerme afrontar esta Tesis con ilusión y esperanza. Te encontré como director, y ahora que me voy, me llevo un amigo. Te deseo los mejores logros. Al doctor Pedro Nieto Mesa por ayudarme a desentrañar al menos la superficie de los engranajes que componen la resonancia magnética nuclear, y por estar ahí cuando lo he necesitado.

Gracias a mi tutora Francisca Cabrera Escribano que me vio nacer científicamente hablando, y guió mis primeros pasos en el laboratorio enseñándome tanto metodología de trabajo como valores humanos y personales que me acompañarán toda la vida. Agradecer a Antonio Franconetti y a Lidia Contreras por quererme y soportarme a partes iguales, y por comenzar esta senda en el Laboratorio 2 junto a mí. Lidia, tu constancia y perseverancia te llevará lejos, confío en ti. Y tú Antonio, ya te lo he dicho muchas veces, eres un ejemplo a seguir como investigador, pero hasta el agua es tóxica cuando se bebe en exceso.

A todos mis compañeros del laboratorio 5-6, mi familia en estos años, por allanarme el camino y estar ahí siempre que os he necesitado, gracias por todo. A José Juan, Ainhoa, Javier Ramos, Teresa, Ana, Pedro Ramírez y Carmen. Sois unos “*máquinas*”, gracias por mostrarme el camino correcto y por ayudarme en mis inicios, me hubiera gustado compartir más tiempo con vosotros. A Noelia por ser un amor de persona y por esos bailes que te marcas cada vez que te miro, por intentar tener siempre una sonrisa en la cara y por ser como eres. También gracias por aguantar mis maullidos en el laboratorio sin agredirme. A mi “*Stacy Malibú*” MJ, por esas charlas y esos ratos tan necesarios para poder desconectar y continuar con el día a día sin perecer en el intento. A Jorge por ser un vallisoletano con salero, por demostrarme que disfruta de la buena música y de la buena compañía, por esos ratos y cafés después de comer, y por recordarme diariamente que “*tempus fugit*”. A Leonardo por mostrarme “*Las Golondrinas*” en mi Sevilla natal y compartir esos buenos ratos en el centro. A Susana por ser un referente y un ejemplo a seguir, alguien de quien aprender y con quien poder contar siempre. A Noel, por esos buenos ratos con o sin mandos, por entender mis manías de trabajo y hacerme compañía en el “lado oscuro” del laboratorio. He encontrado en ti a una persona genial, gracias por tu amistad. A Myriam, mi “*TopChef*” favorita, por tu desparpajo y tu personalidad arrolladora, por enseñarme que se puede vivir sin filtro y por ser genial como eres. A Antonio Di Maio y a Anna, mi familia napolitana, por ser como un hermano y por ayudarme siempre que lo he necesitado, por servirme de apoyo en estos años, compartiendo aficiones y debates aún siendo contrapunto a mis opiniones. Por tus consejos, tiempo y dedicación durante estos años, que no habrían sido iguales sin ti.

A aquellas personas que aunque solo fuera durante algunos meses, compartieron su tiempo, sus ánimos, sus opiniones y puntos de vista conmigo. Ruiyi, Blanka, Alice, Rossana e Inês.

Agradecer a todos los compañeros del centro con los que he compartido momentos inolvidables. Por esa alegría y buen rollo que contagiáis. A Antonio Romero por los intensos debates comiendo y a Tania, Alberto, Elena, Crustuab, Patri y Carmen por las meriendas y esas risas tan necesarias.

Por otra parte, me gustaría agradecer a aquellas personas con las que he compartido mis días en el ámbito personal durante la gestación de la presente Tesis. Aguantando mis días malos y mi poco tiempo para compartir con ellos, apoyándome siempre e impulsándome a continuar el camino marcado. Os quiero muchachos: Agu, Laura, Damián, Guille, Susana, Bea, Manu, Alberto, Laura, Ale y Luisa.

A mi familia mairenera, a Gume por su alegría natural, por sus consejos y su visión de la vida, por aceptarme desde un principio y no sacar la escopeta el primer día, gracias por ser como eres. Y a mi madre política, Conchi, un ejemplo de trabajo, esfuerzo, dedicación y tesón, por interesarte en mis aficiones y acordarte siempre de mí. Muchas gracias.

Me gustaría agradecer a mi familia, que me ha enseñado en cada etapa a crecer, dándome todas las oportunidades del mundo. A mi hermano Emilio de quien aprendí la curiosidad por las cosas, a mi madre María de los Ángeles por apoyarme y confiar siempre en mí, tanto en los momentos buenos como en los malos y a mi padre Emilio que siempre se ha sacrificado

para que pueda estar donde estoy ahora y ser quien soy hoy. Gracias por todo, os quiero.

Y por último, agradecerte a ti, Inma, que has sido un apoyo constante e incondicional a lo largo de estos años. Quiero agradecerte como has transformado con tu alegría y tu sonrisa todos los días grises que hemos encontrado en días geniales. Por todo el cariño que me has demostrado y la paciencia que has tenido conmigo, especialmente en este último tramo de escritura, que se que ha sido duro. Esta Tesis no habría podido existir sin ti, gracias por ser como eres, no cambies nunca, yo creo en ti y sé que eres la mejor y que puedes con todo.



# ABREVIATURAS

Ac: Acetilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AscNa: Ascorbato sódico

AT-III: Antitrombrina III

bs: Singlete ancho

BSA: Albúmina de suero bovino

CD44: Clúster de diferenciación 44

COSY: Espectroscopía correlacionada de núcleos de la misma especie

CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos

CS: Sulfato de condroitina

CS-A: Sulfato de condroitina de tipo A

CS-B: Sulfato de condroitina de tipo B

CS-D: Sulfato de condroitina de tipo D

CS-E: Sulfato de condroitina de tipo E

CS-H: Sulfato de condroitina de tipo H

CS-K: Sulfato de condroitina de tipo K

CuAAC: Cicloadición entre azida-alquino catalizada por Cu (I)

d: Doblete

dd: Doble doblete

DBU: 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-eno

DCC: *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida

DCM: Diclorometano

DCs: Células dendríticas

DEG: Dietilenglicol

DMAP: Dimetilaminopiridina

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DS: Sulfato de dermatano

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ESI: Ionización mediante electrospray

FGF: Factor de crecimiento para fibroblastos

FITC: Fluoresceína Isotiocianato

FP: Polarización de fluorescencia

FXa: Factor X de la coagulación

GAGs: Glicosaminoglicanos

Gal: D-Galactosa

GalNAc: *N*-Acetilgalactosamina

GlcA: Ácido D-Glucurónico

GlcNAc: *N*-Acetilglucosamina

HS: Sulfato de heparano

HSQC: Correlación heteronuclear de nivel cuántico individual

IdoA: Ácido L-Idurónico

ITC: Calorimetría de titulación isotérmica

kDa: Kilodalton

KS: Sulfato de queratano

LCs: Células de Langerhans

m: Multiplete

MFA: Monofluoroacetilo

MK: Midkina

MW: Microondas

ND: Dominio cuello

NGF: Factor de crecimiento neuronal

NHS: *N*-Hidroxisuccinimida

ON: Durante toda la noche (overnight)

PAMAM: Poliamidoamina

PBS: Tampón fosfato salino

PEG: Polietilenglicol

Piv: Pivaloilo

ppm: Partes por millón

Py: Piridina

q: Quartete

RMN: Resonancia magnética nuclear

RIP: Potencia inhibitoria relativa

ROMP: Polimerización mediante metátesis de apertura de anillo

r.p.m.: Revoluciones por minuto

r.t.: Temperatura ambiente

s: Singlete

SPR: Resonancia del plasmón de superficie

STD: Diferencia de transferencia de saturación

t: Triplete

TBTA: Tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina

TCA: Tricloroacetilo

TFA: Trifluoroacetilo

TEA: Trietilamina

TMSOTf: Trifluorometanosulfonato de trimetilsililo

TLC: Cromatografía en capa fina

Tris: Tris(hidroximetil)aminoetano

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

WGA: Aglutinina del germen de trigo

Xyl: D-Xilosa

XylT: Xilosil transferasa



# RESUMEN

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos altamente sulfatados y heterogéneos que participan en un gran número de procesos biológicos por interacción con determinadas proteínas. Con el fin de conocer el mecanismo molecular de dichas interacciones y modular las funciones biológicas de estos carbohidratos, existe un gran interés en la preparación de moléculas que imiten a los GAGs.

En este contexto, en la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado una estrategia sintética eficiente para la preparación de dendrímeros que presentan ligandos disacáridicos de sulfato de condroitina de tipo E (CS-E), un polisacárido de tipo GAG implicado en numerosos procesos biológicos relevantes, como miméticos del producto natural. La aproximación sintética desarrollada se basa en la reacción de cicloadición 1,3 dipolar, catalizada por Cu (I), entre disacáridos desprotegidos de CS-E con un grupo azido en su terminal reductor y núcleos dendríticos que poseen grupos alquino en su estructura. De esta forma, se han preparado, con un alto rendimiento, dendrímeros de primera generación con valencia 3, 4 y 6, como sistemas multivalentes monodispersos con estructura química bien definida. Además, la síntesis de un dendrón trivalente funcionalizado ortogonalmente en su posición focal ha permitido tanto la preparación de un dendrón marcado fluorescentemente, como la obtención, usando una ruta sintética convergente, de dendrímeros de CS-E de 2ª generación, que presentan en su estructura 9, 12 y 18 copias del disacárido.

Una vez sintetizados los sistemas multivalentes, se estudió su interacción con dos proteínas que reconocen GAGs, mediante el uso de diversas técnicas. Por un lado, experimentos de competición de Polarización de Fluorescencia demostraron la interacción entre los dendrímeros sintetizados y la Midkina, una proteína implicada en el crecimiento y proliferación celular. Los resultados confirmaron que la

disposición multivalente del disacárido aumenta su capacidad de interaccionar con la proteína.

Por otra parte, se llevaron a cabo estudios de interacción entre algunos de los dendrímeros sintetizados a lo largo de la Tesis y la Langerina, una lectina tipo C implicada en el sistema inmunológico. Tanto los experimentos de STD como los de Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR), demostraron la interacción de los dendrímeros con la Langerina y el aumento de la afinidad, en comparación con el ligando disacarídico, debido al efecto multivalente, confirmando la utilidad de los sistemas multivalentes sintetizados como miméticos de los polisacáridos naturales.



# ÍNDICE

1. Introducción.....	25
1.1. Carbohidratos de membrana.....	27
1.2. Glicosaminoglicanos (GAGs).....	31
1.2.1. Familia I. Heparina y Sulfato de Heparano (HS).....	34
1.2.2. Familia II. Sulfato de Condroitina (CS) y Sulfato de Dermatanos (DS).....	37
1.2.3. Familia III. Sulfato de Queratano (KS).....	38
1.2.4. Familia IV. Ácido Hialurónico.....	39
1.2.5. Funciones biológicas de los GAGs.....	39
1.2.5.1. Funciones biológicas del Sulfato de Heparano (HS) y la Heparina.....	40
1.2.5.2. Funciones biológicas del Sulfato de Condroitina (CS) y el Sulfato de Dermatanos (DS).....	43
1.2.5.3. Funciones biológicas del Ácido Hialurónico.....	44
1.3. Glicomiméticos.....	46
1.3.1. Glicomiméticos de GAGs.....	48
1.3.2. Glicomiméticos de GAGs multivalentes.....	50
1.3.2.1. Sistemas multivalentes de GAGs basados en oligopéptidos.....	51
1.3.2.2. Sistemas multivalentes de GAGs basados en polímeros.....	52
1.3.2.3. Sistemas multivalentes de GAGs basados en dendrímeros.....	55
1.4. Dendrímeros y dendrones.....	57
1.4.1. Síntesis de dendrímeros.....	59

1.4.1.1.	Síntesis divergente.....	62
1.4.1.2.	Síntesis convergente.....	63
1.4.2.	Glicodendrimeros.....	64
2.	Objetivos.....	67
3.	Síntesis de dendrimeros de 1ª generación como Glicomiméticos del CS-E y estudios de interacción con la Midkina.....	73
3.1.	Introducción.....	75
3.1.1.	Cáncer y factores de crecimiento.....	75
3.1.2.	Factores de crecimiento. Midkina.....	76
3.2.	Resultados y discusión.....	83
3.2.1.	Síntesis del disacárido (GlcA-GalNAc 4,6-di-OSO <sub>3</sub> ) de repetición.....	83
3.2.2.	Síntesis de los núcleos dendriméricos <b>16</b> , <b>17</b> y <b>18</b> .....	92
3.2.3.	Formación de los glicodendrimeros <b>19</b> – <b>24</b> .....	93
3.2.4.	Estudios de interacción proteína-ligando.....	105
3.2.4.1.	Polarización de Fluorescencia (FP).....	107
3.2.4.2.	Interacción mediante Polarización de Fluorescencia de los glicodendrimeros y la Midkina.....	111
4.	Síntesis de dendrones y dendrimeros de CS-E de 2ª generación.....	123
4.1.	Resultados y discusión.....	125
4.1.1.	Síntesis del dendrón funcionalizado ortogonalmente en su posición focal.....	127
4.1.2.	Síntesis de un dendrón marcado fluorescentemente.....	131

4.1.2.1.	Metodología sintética A para preparar el dendrón fluorescente <b>33</b> .....	133
4.1.2.2.	Metodología sintética B para preparar el dendrón fluorescente <b>33</b> .....	135
4.1.2.3.	Metodología sintética C para preparar el dendrón fluorescente <b>35</b> .....	138
4.1.3.	Síntesis de dendrímeros de segunda generación.....	140
4.1.3.1.	Obtención de los dendrímeros de segunda generación, miméticos de CS-E, <b>36</b> , <b>37</b> y <b>38</b> .....	141
4.1.3.2.	Caracterización mediante espectrometría de masas MALDI-ToF de los dendrímeros de segunda generación <b>36</b> , <b>37</b> y <b>38</b> .....	150
5.	Interacción de sistemas multivalentes dendriméricos de CS-E con Langerina.....	159
5.1.	Introducción.....	161
5.1.1.	Lectinas de tipo C: La Langerina.....	161
5.2.	Resultados y discusión.....	166
5.2.1.	Estudios de interacción dendrímero-Langerina .....	166
5.2.1.1.	Estudios de interacción dendrímero-Langerina mediante técnicas de RMN .....	166
5.2.1.2.	Síntesis de dendrímeros marcados con átomos de flúor.....	172
5.2.1.3.	Síntesis del disacárido de repetición marcado con flúor.....	175
5.2.1.4.	Síntesis de los dendrímeros de primera generación marcados con flúor.....	181

5.2.2. Estudios de interacción dendrímero-Langerina mediante experimentos de Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR).....	185
6. Conclusiones.....	193
7. Parte experimental.....	197
7.1. Disolventes y reactivos.....	199
7.2. Técnicas y aparatos.....	199
7.3. Procedimientos sintéticos y caracterización estructural de los compuestos preparados.....	202
Anexo de espectros.....	241

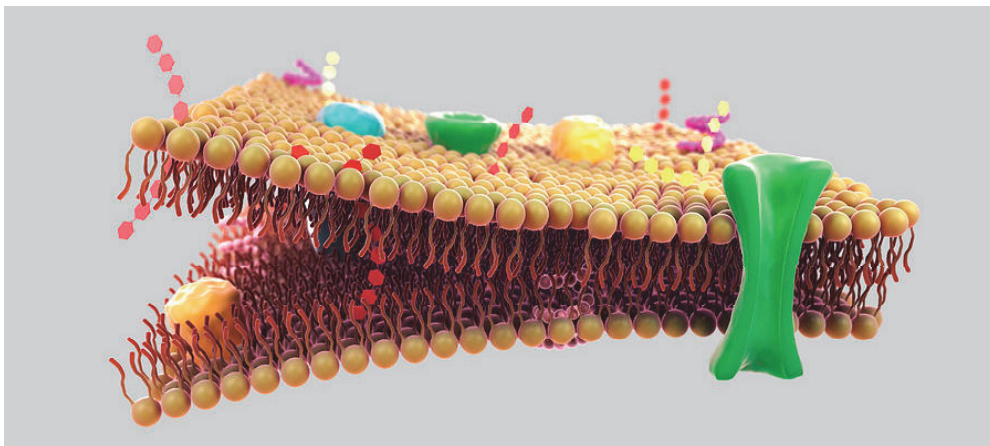
## CAPÍTULO 1.

# INTRODUCCIÓN.



## 1.1. Carbohidratos de membrana

La membrana plasmática o celular se define como una bicapa lipídica formada por dos láminas que incluyen diversos tipos de fosfolípidos, glicolípidos y proteínas, que delimita a la célula. (**Figura 1.1**) Dicha membrana, al ser la interfase entre el exterior y el interior celular, es la encargada de regular la entrada y salida de numerosas sustancias entre el citoplasma y el medio extracelular. Pese a que antiguamente se definiera como un conjunto estático formado por capas sucesivas de proteínas y lípidos, hoy en día se concibe como una estructura dinámica de biomoléculas, que fue denominada en 1972 “mosaico fluido” por los investigadores S. J. Singer y G. L. Nicolson.<sup>1</sup>



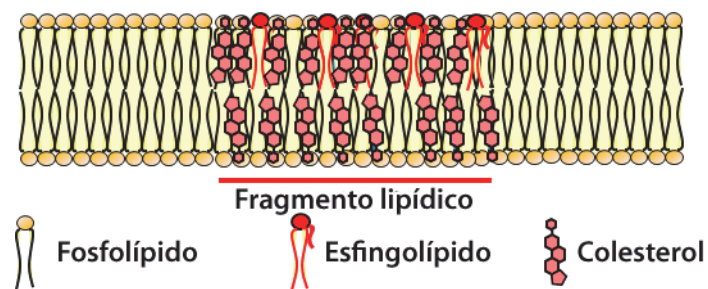
**Figura 1.1.** Representación de la membrana celular. Imagen extraída de la web <https://es.stuklopechat.com>

La composición química de dicha membrana está formada casi en su totalidad por lípidos, siendo las proteínas y los carbohidratos una pequeña parte de su estructura. La parte lipídica de la membrana está constituida

---

<sup>1</sup> Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, 175, 720-731.

principalmente por fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol. (**Figura 1.2**) Los fosfolípidos, componentes mayoritarios de la membrana, son sustancias generadas a partir de glicerol, ácido fosfórico y ácidos grasos. Los esfingolípidos están constituidos por ceramidas que contienen esfingosina y ácidos grasos. El colesterol es el último componente lipídico de la membrana del que hablaremos. Representa cerca del 25% de la composición de lípidos y es considerado clave para la fluidez de la membrana.

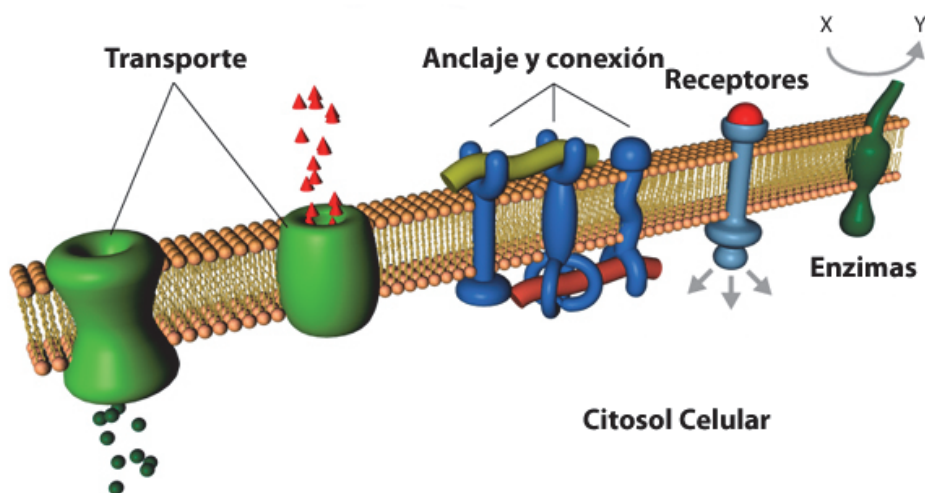


**Figura 1.2.** Esquema lipídico de la membrana plasmática. Imagen extraída de la web <https://surrealsciencestuff.wordpress.com>

En cuanto a la parte proteica de la membrana, en general se pueden diferenciar distintos tipos de proteínas en función de cómo se encuentren dispuestas en el mosaico fluido o cuáles sean sus funciones. (**Figura 1.3**) Estructuralmente puede hacerse una distinción entre proteínas integrales o periféricas. Las periféricas están conectadas a los lípidos de la membrana mediante enlaces covalentes, ya sea por la parte interna o externa de la célula. Las proteínas integrales, en cambio, son aquellas que se encuentran formando parte del mosaico fluido. Algunas solo abarcan una parte de la membrana, mientras que otras la atraviesan de un lado a otro, denominándose estas últimas, proteínas transmembrana. Dependiendo de la función que desempeñen las diferentes proteínas, estas puede clasificarse



también en proteínas receptoras, que están encargadas de la recepción y transducción de señales químicas; proteínas de transporte, que forman canales y actúan como poros que permiten la entrada y salida de determinadas sustancias de la célula; enzimas, que tienen como función catalizar reacciones en la superficie celular; y proteínas de anclaje, que son aquellas que tienen como objetivo tanto la fijación del citoesqueleto en el citosol, como la conexión con biomoléculas del exterior celular a la membrana plasmática.

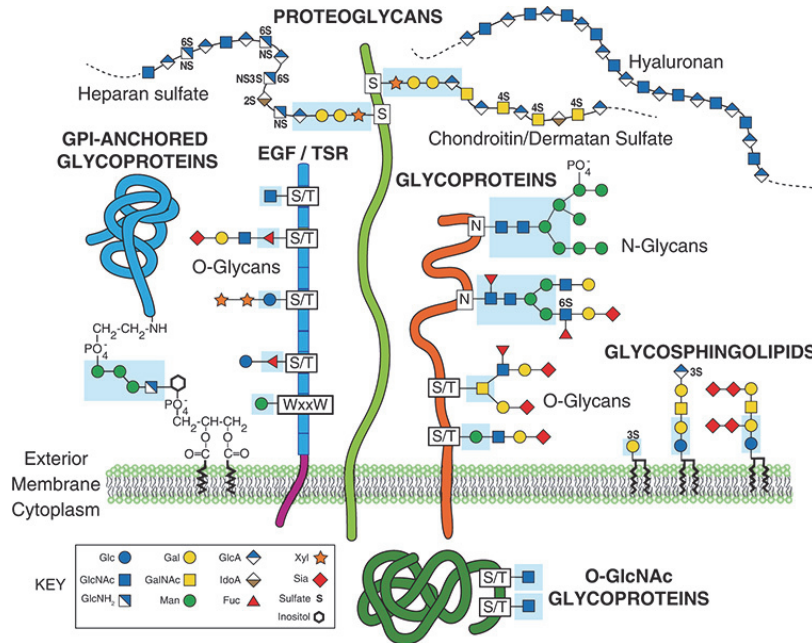


**Figura 1.3.** Funciones desarrolladas por las proteínas de la membrana celular. Imagen extraída de la web “membranaplasmaticabiologia.blogspot.com”

En la parte exterior de la membrana celular, los carbohidratos coexisten con lípidos o proteínas formando el llamado glicocáliz.<sup>2</sup> Esta cubierta posee una alta abundancia de oligosacáridos y polisacáridos unidos tanto a lípidos como a proteínas, formando los denominados glicolípidos y glicoproteínas, respectivamente. **(Figura 1.4)** Estos azúcares cumplen una importante

<sup>2</sup> Sprovieri, P.; Martino, G. *Physiol. Res.* **2018**, 67, 1-11.

función, ya que tienen la capacidad de reconocer, en caso de que fuera necesario, a cuerpos extraños o exógenos, tales como bacterias, virus o células foráneas.



**Figura 1.4.** Esquema de glicoproteínas de la membrana plasmática. Imagen obtenida del libro “Varki, A.; Kornfeld, S. *Essential of Glycobiology*, 2017, Capítulo 1”

Dentro de la familia de las glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular, están los proteoglicanos. Estos compuestos constan de un núcleo de naturaleza proteica, al que se encuentran unidos una serie de oligosacáridos con estructuras características denominados glicosaminoglicanos (GAGs). Dicha familia de carbohidratos se caracteriza por la alta densidad de carga negativa que contienen sus cadenas, debido al elevado número de grupos sulfato y carboxilato que presentan en su estructura.

## 1.2. Glicosaminoglicanos (GAGs)

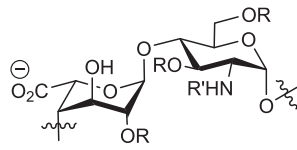
Esta familia de polisacáridos naturales, que como se ha mencionado anteriormente componen la fracción glucídica de los proteoglicanos, desempeñan importantes funciones en la parte externa celular. Así, actúan como moduladores de señales en procesos de comunicación entre la célula y su entorno.<sup>3</sup> Los GAGs son polisacáridos no ramificados de estructura heterogénea. En líneas generales, están compuestos por unidades disacarídicas repetitivas de hexopiranosas, consistentes por una parte de un ácido urónico (ácido  $\alpha$ -L-idurónico o ácido  $\beta$ -D-glucurónico) y por otra parte, de un amino azúcar (*N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina o *N*-acetil- $\beta$ -D-galactosamina) unidas ambas mediante enlace (1 $\rightarrow$ 3) o (1 $\rightarrow$ 4).

En función de la naturaleza de los monosacáridos que formen el tándem, del tipo de enlace que haya entre ellos y de la localización y número de grupos sulfatos presentes en el disacárido, los GAGs pueden ser clasificados en 4 grandes familias. (**Figura 1.5**) La primera de ellas estaría constituida por la heparina y el sulfato de heparano (HS); la segunda, por el sulfato de condroitina (CS) y el sulfato de dermatano (DS); la tercera, por el sulfato de queratano (KS); y la cuarta y última familia estaría constituida por el ácido hialurónico.

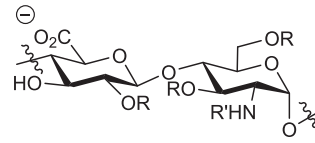
---

<sup>3</sup> Handel, T. M.; Johnson, Z.; Crown, S. E.; Lau, E. K.; Sweeney, M.; Proudfoot, A. E. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 385-410.

## Familia I

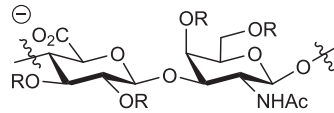


Heparina

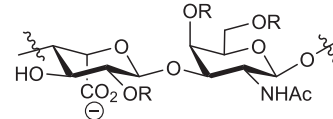


Sulfato de heparano (HS)

## Familia II

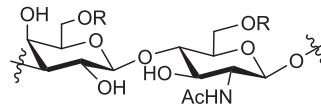


Sulfato de condroitina (CS)



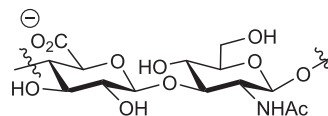
Sulfato de dermatano (DS)

### Familia III



Sulfato de queratano (KS)

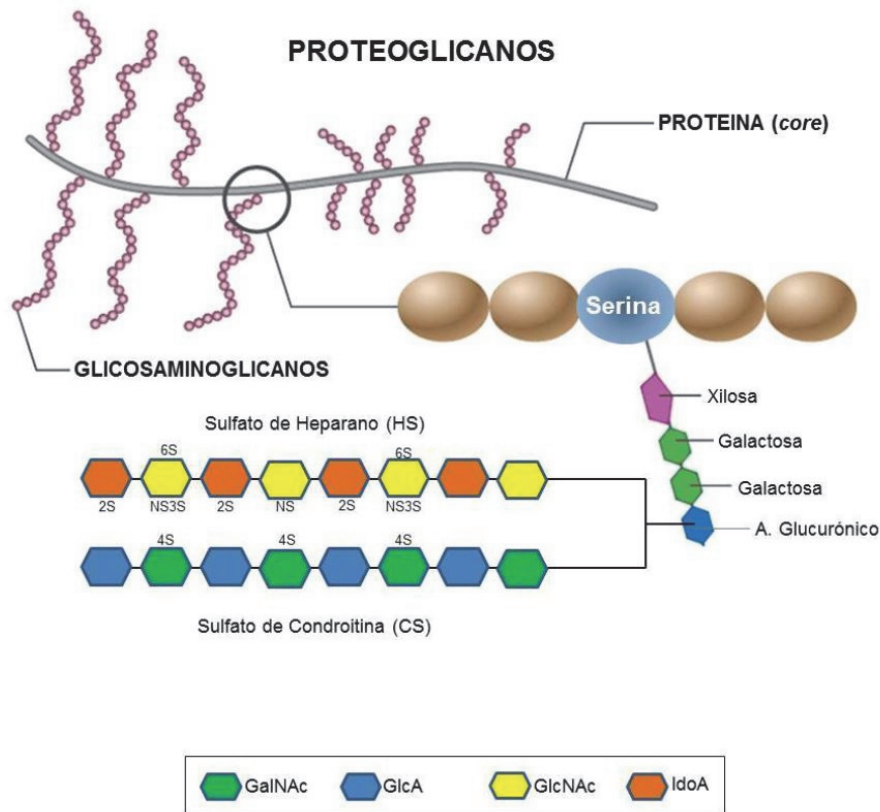
### Familia IV



Ácido hialurónico

**Figura 1.5.** Diferentes familias de GAGs y sus unidades disacáridas de repetición características. R=SO<sub>3</sub><sup>-</sup> o H; R'=SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, COCH<sub>3</sub> o H.

La biosíntesis de estos azúcares es un proceso complejo, acorde con la heterogeneidad de los polisacáridos naturales. La ruta biosintética comienza con la formación de un tetrasacárido característico, acoplado a un aminoácido (serina) de la proteína. (**Figura 1.6**)



**Figura 1.6.** Biosíntesis de cadenas polisacáridicas de GAGs. Imagen extraída de la web <http://www.krooart.com/>

A la Serina se une un residuo de xilosa (Xyl) mediante la acción de una enzima denominada xilosil transferasa (XylT). Una vez anexionada la Xyl, las galactosil transferasas cumplen su función, uniendo a la misma dos residuos de galactosa. Finalmente, otra enzima denominada glucuronil transferasa, une un residuo de ácido glucurónico, formando así la estructura que se repite en la biosíntesis de todos los GAGs,  $\text{GlcA}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{Xyl}\beta(1\rightarrow\text{O})\text{Serina}$ .

Una vez formado el tetrasacárido inicial de anclaje, se produce la elongación de la cadena, mediante la transferencia de *N*-acetil galactosamina o *N*-acetil glucosamina. Este paso define el tipo específico de GAG que será sintetizado a continuación.<sup>4</sup> Tras ello, se produce la construcción final de la cadena mediante la acción de glicosil transferasas multidominio que se encargan de ir adjuntando residuos sucesivos de ácido glucurónico, *N*-acetil galactosamina o *N*-acetil glucosamina. Una vez formadas las cadenas, enzimas como las sulfotransferasas o las epimerasas son las encargadas de introducir grupos sulfatos a la cadena y de producir la epimerización de ciertos residuos de GlcA en IdoA, respectivamente. Todo ello constituye un complejo proceso que conduce a estructuras tremendamente heterogéneas, pero enriquecidas habitualmente en alguno de los patrones disacáridicos, de estructura definida, que serán comentados a continuación.<sup>5</sup>

### 1.2.1. Familia I. Heparina y Sulfato de Heparano (HS)

El disacárido característico de la heparina está compuesto de un residuo de ácido urónico, principalmente ácido L-idurónico, unido mediante enlace (1→4) con un monosacárido de D-glucosamina, siguiendo la secuencia IdoA $\alpha$ (1→4)GlcN $\alpha$ (1→4). Este polisacárido natural ha sido históricamente empleado como anticoagulante.<sup>6</sup> Tiene un peso molecular que se encuentra

---

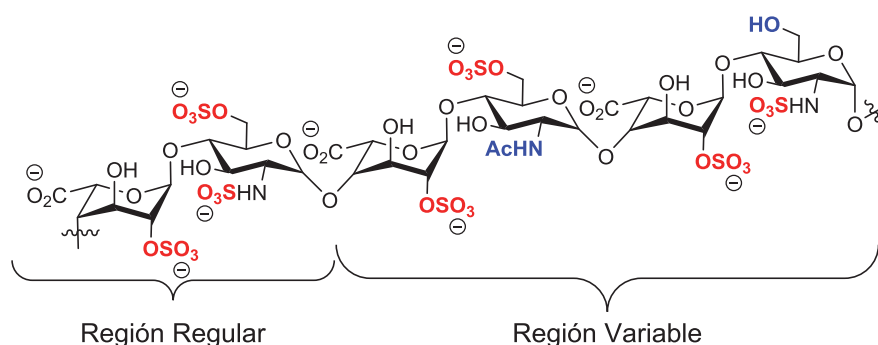
<sup>4</sup> Sasarman, F.; Maftai, C.; Campeau, P. M.; Guitton, C. B.; Mitchell, G. A.; Allard, P. J. *Inherit. Metab. Dis.* **2016**, 39, 173-188.

<sup>5</sup> *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology*, Eds. Kamerling, H.; Uyama, T.; Kitagawa, H.; Sugahara, K. N.; Elsevier Science, **2007**, Vol 3, 79-104.

<sup>6</sup> a) Gray, E.; Hogwood, J.; Mulloy, B. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2012**, 207, 43-61; b) Estes, J. W. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **1970**, 212, 1492-1495.

entre 5 y 40 kDa, caracterizándose además por encontrarse principalmente en células del tejido conjuntivo, denominadas mastocitos.

La heterogeneidad de estos compuestos se debe principalmente a la existencia de diversos patrones de sulfatación en el disacárido. Por ejemplo, tanto las posiciones 2 de los ácidos urónicos, como las posiciones 2 (grupo amino), 3 ó 6 de la glucosamina pueden estar sulfatadas. La unidad disacáridica de heparina mayoritaria está sulfatada en la posición 2 del ácido L-idurónico y en las posiciones 2 (grupo amino) y 6 de la glucosamina. Estas regiones del polisacárido que están regidas por este patrón de grupos sulfato, son denominadas *región regular* de la heparina, mientras que el resto de regiones, compuestas por los restantes patrones de sulfatación posibles, son denominadas como *región variable*.<sup>7</sup> (Figura 1.7)



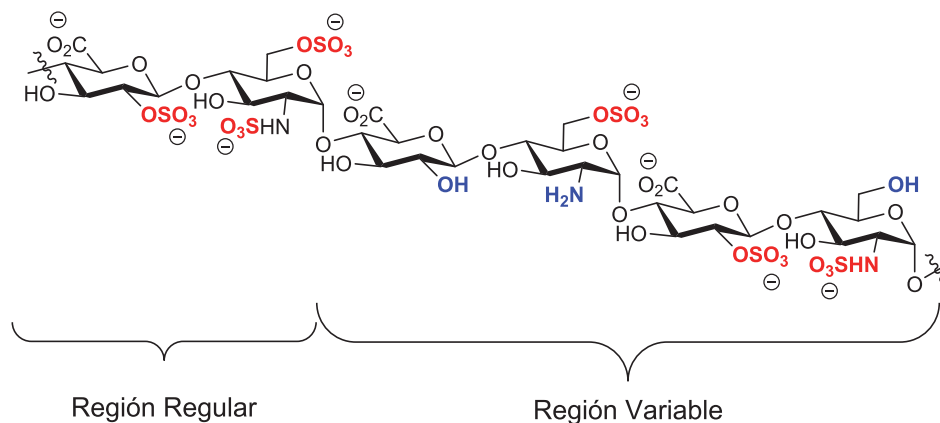
**Figura 1.7.** Ilustración de la región regular y la región variable en un polisacárido de heparina.

Por otra parte, la secuencia disacáridica característica del sulfato de heparano está compuesta de ácido D-glucurónico (en lugar de idurónico) y N-acetil glucosamina, unidas mediante enlace (1→4) con la secuencia GlcAβ(1→4)GlcNAcα(1→4). De esta forma puede observarse la estrecha

<sup>7</sup> Noti, C.; Seeberger, P. H. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 731-756.

relación estructural entre la heparina y el HS, pese a que este último se encuentra ampliamente distribuido en diferentes tipos de células, lo que, a priori, le confiere un mayor número de funciones fisiológicas. En comparación con la heparina, los polisacáridos de HS son generalmente más largos. Esto supone un aumento de peso molecular de estas cadenas, con un intervalo de 5 a 50 kDa, teniendo un peso molecular promedio de 30 kDa.

En el caso del HS, también podemos encontrar una región regular y otra variable. La región regular consiste en la fracción de disacáridos que contienen grupos sulfato en la posición 2 del ácido D-glucurónico y en las posiciones 2 (grupo amino) y 6 de la glucosamina. (**Figura 1.8**) Al igual que en el caso de la heparina, el conjunto de patrones de sulfatación que no constituye la región regular es considerado región variable.



**Figura 1.8.** Ilustración de la región regular y la región variable en un polisacárido de sulfato de heparano.

La heparina es considerada el GAG natural más sulfatado, ya que pese a tener una región regular, al igual que el HS, compuesta por unidades



disacarídicas con 3 grupos sulfato, en el caso de la heparina la presencia de esta región regular es proporcionalmente mayoritaria.<sup>8</sup>

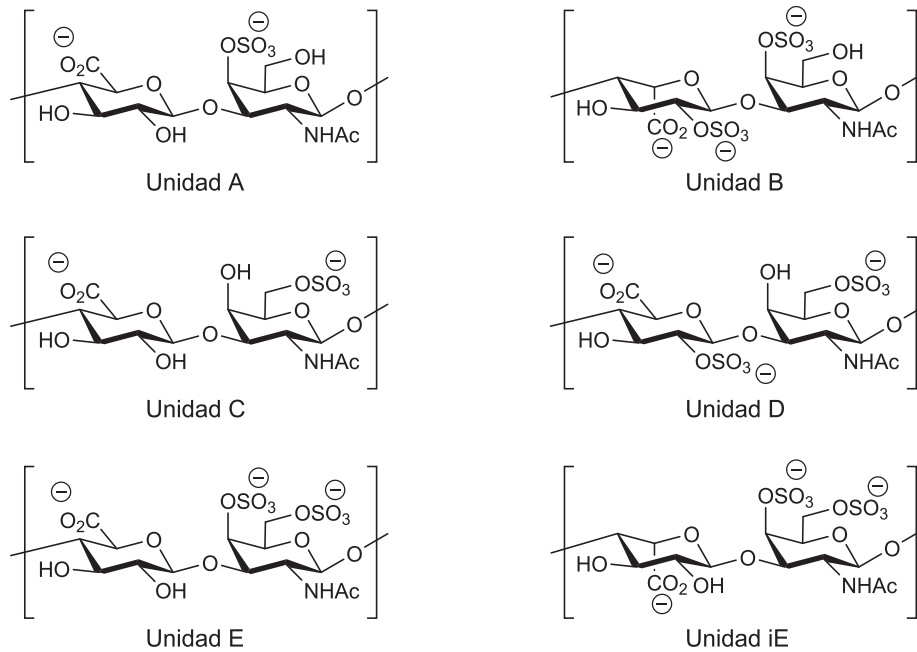
### 1.2.2. Familia II. Sulfato de Condroitina (CS) y Sulfato de Dermatano (DS)

Los dos GAGs que forman esta familia tienen también estructuras lineales y muy heterogéneas. En el caso del sulfato de condroitina (CS), el disacárido característico está constituido por la repetición de unidades de ácido D-glucurónico y *N*-acetil galactosamina, siguiendo la secuencia GlcA $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4). El sulfato de dermatano (DS) posee un patrón disacarídico de repetición similar al del CS pero cambiando el ácido D-glucurónico por ácido L-idurónico, siguiendo la secuencia IdoA $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 3)GalNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4). En el caso del CS y del DS, los diversos patrones de sulfatación que se observan en la naturaleza se encuentran clasificados en diferentes tipos, tal y como se muestra en la **Figura 1.9**.<sup>9</sup>

---

<sup>8</sup> a) Soares da Costa, D.; Reis, R. L.; Pashkuleva, I. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2017**, *19*, 1-26; b) Sasisekharan, R.; Venkataraman, G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 626-631.

<sup>9</sup> a) Trowbridge, J. M.; Gallo, R. L. *Glycobiology* **2002**, *12*, 117-125; b) Sugahara, K.; Mikami, T.; Uyama, T.; Mizuguchi, S.; Nomura, K.; Kitagawa, H. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2003**, *13*, 612-620.



**Figura 1.9.** Unidades disacáridicas de repetición típicas que se encuentran en las cadenas del CS y del DS. Las diferentes unidades A, B, C, D, E e iE son características de CS-A, DS-B, CS-C, CS-D, CS-E y DS-E, respectivamente. La abreviatura “i” en “iE” significa IdoA.

### 1.2.3. Familia III. Sulfato de Queratano (KS)

El sulfato de queratano (KS) es el GAG más peculiar, ya que no cuenta en su estructura característica con ácidos urónicos, y tiene la capacidad de formar polisacáridos ramificados, a diferencia del resto de GAGs. En el caso de este singular carbohidrato, el disacárido que lo caracteriza está compuesto de D-galactosa y D-glucosamina *N*-acetilada, con una secuencia  $\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow3)$ . El patrón de sulfatación más común presenta las posiciones 6 de la Gal y de la GlcNAc sulfatadas, tal y como se observa en la **Figura 1.5**.

### 1.2.4. Familia IV. Ácido Hialurónico

Este último GAG del que hablaremos a continuación se caracteriza porque es el único de los compuestos descritos que no posee grupos sulfatos en su unidad disacáridica característica. El ácido hialurónico fue aislado por primera vez por Meyer y Palmer del humor vítreo bovino en el año 1934.<sup>10</sup> Este polisacárido está formado por la unión de ácido D-glucurónico y D-glucosamina *N*-acetilada, siguiendo la secuencia GlcA $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4). (Figura 1.5) El ácido hialurónico se encuentra ampliamente distribuido por los tejidos neuronales, epiteliales y conectivos e interviene en la proliferación y en la migración celular, hecho que lo relaciona con el crecimiento de diversos tumores.

### 1.2.5. Funciones biológicas de los GAGs

Una de las principales consecuencias que conlleva la inmensa diversidad estructural de este tipo de carbohidratos es el amplio abanico de proteínas, tales como quimioquinas, factores de crecimiento y enzimas, con los que esta familia de compuestos es capaz de unirse e interactuar.<sup>11</sup>

Ello implica que las funciones biológicas de los diferentes tipos de GAGs que se verán a continuación son muy numerosas, incluyendo señalización, crecimiento, migración y desarrollo celular, angiogénesis, procesos de

<sup>10</sup> Meyer, K.; Palmer, J. W. *J. Biol. Chem.* **1934**, *107*, 629-634.

<sup>11</sup> a) Monneau, Y.; Arenzana-Seisdedos, F.; Lortat-Jacob, H. *J. Leukocyte Biol.* **2016**, *6*, 935-953; b) Rudd, T. R.; Uniewicz, K. A.; Ori, A.; Guimond, S. E.; Skidmore, M. A.; Gaudesi, D.; Xu, R.; Turnbull, J. E.; Guerrini, M.; Torri, G.; Siligardi, G.; Wilkinson, M. C.; Fernig, D. G.; Yates, E. A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *23*, 5390-5397; c) Capila, I.; Linhardt, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 390-412.

adhesión, crecimiento neuronal y anticoagulación, entre otros.<sup>12</sup> A continuación, se exponen algunas de las funciones biológicas más representativas de estos compuestos.

#### 1.2.5.1. Funciones biológicas del Sulfato de Heparano (HS) y la Heparina

Estos GAGs han sido los más amplia e históricamente estudiados, principalmente por su participación en el proceso de anticoagulación. La heparina fue originalmente aislada en células hepáticas. Su descubrimiento data de 1916, aunque no se ha esclarecido completamente si su descubridor fue el científico estadounidense William Howell o su alumno Jay McLean, que lo aisló en la Escuela de Medicina John Hopkins, en la ciudad de Baltimore.

Cuando los animales sufren una lesión vascular, la respuesta fisiológica que evita pérdidas excesivas de sangre se denomina hemostasia. Esta respuesta consiste en un conjunto de mecanismos que dan lugar a la formación de coágulos para detener la hemorragia, y a continuación poder reparar los daños causados, reabsorbiendo finalmente los coágulos formados.<sup>13</sup>

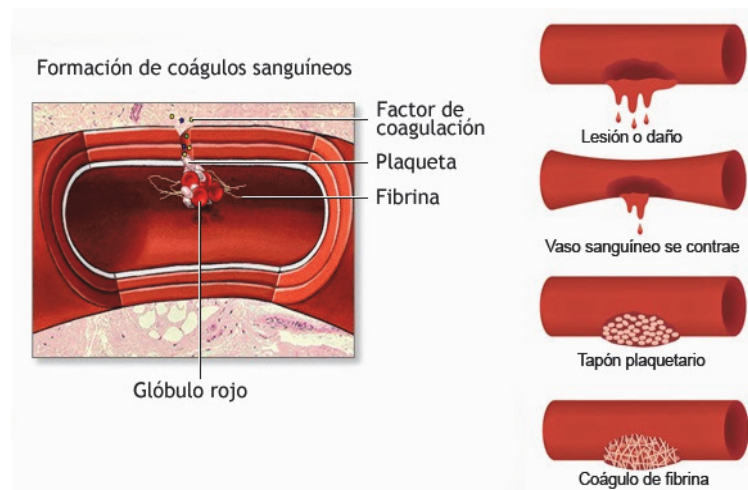
Una vez se genera una lesión vascular, en primer lugar, se produce la constricción del vaso sanguíneo para reducir el flujo de sangre, seguida de la adhesión de plaquetas en la zona del traumatismo. (**Figura 1.10**) Tras ello, se

---

<sup>12</sup> Raman, R.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 267-277.

<sup>13</sup> Sakurai, Y.; Hardy, E. T.; Ahn, B.; Tran, R.; Fay, M. E.; Ciciliano, J. C.; Mannino, R. G.; Myers, D. R.; Qiu, Y.; Carden, M. A.; Baldwin, W. H.; Meeks, S. L.; Gilbert, G. E.; Jobe, S. M.; Lam, W. A. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 509-517.

produce una intrincada serie de reacciones enzimáticas en las que participan las proteínas encargadas de la coagulación, entre ellas la trombina, agente dedicado a la generación de coágulos. Todo ello conduce finalmente a la formación de un tapón estable de fibrina.



**Figura 1.10.** Esquema del proceso de hemostasia. Imagen extraída de la web <http://estudiaenciclopedia.blogspot.com>

Para evitar que este fenómeno de coagulación se produzca fuera de la zona lesionada, provocando una posible coagulación intravascular, existen otras enzimas, tales como la antitrombina III (AT-III), que inhibe la trombina de forma que la coagulación quede circunscrita únicamente a la lesión. La AT-III es una glicoproteína con un peso molecular de unos 58 kDa cuya interacción con heparina consigue mejorar en más de 1000 veces su potencia inhibitoria sobre la trombina, mediante la formación de un complejo ternario heparina-trombina-AT-III.<sup>14</sup>

<sup>14</sup> Desai, U. R.; Petitou, M.; Björk, I.; Olson, S. T. J. *Biol. Chem.* **1998**, 273, 7478-7487.

A nivel molecular, la acción de la heparina sobre la AT-III se debe a la interacción específica entre dicha proteína y una secuencia pentasacáridica concreta, cuya estructura y patrón de sulfatación se muestra en la **Figura 1.11**, y que representa tan solo el 3% del polisacárido natural. Es decir, esta secuencia minoritaria de heparina es la responsable de su actividad anticoagulante y este hecho justifica el interés en la síntesis química<sup>15</sup> o enzimática<sup>16</sup> de este fragmento pentasacáridico.

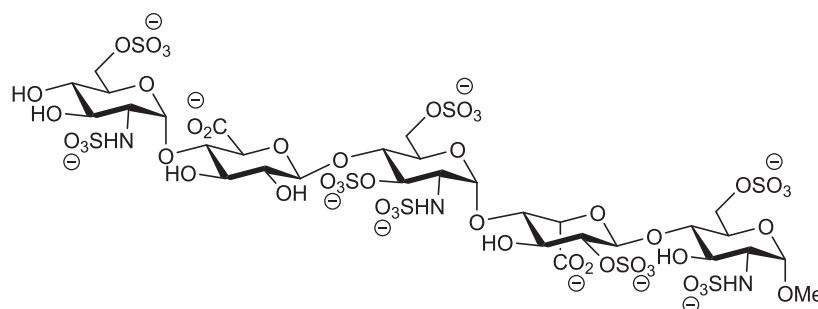
Durante el año 2007 se distribuyeron algunos lotes de heparina polisacáridica de origen animal para uso clínico contaminados con sulfato de condroitina persulfatado. Esta impureza provocó más de 80 muertes y 1000 casos de alergias en Alemania y Estados Unidos.<sup>17</sup> Este incidente puso de manifiesto la importancia del papel de la síntesis orgánica para la obtención de fragmentos de tipo GAG, con una estructura bien definida y responsables de las interacciones con diversas proteínas, como sustitutos de los productos naturales.

---

<sup>15</sup> Choay, J.; Petitou, M.; Lormeau, J. C.; Sinaÿ, P.; Casu, B.; Gatti, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *116*, 492-499.

<sup>16</sup> Linhardt, R. J.; Dordick, J. S.; Deangelis, P. L.; Liu, J. *Semin. Thromb. Hemost.* **2007**, *33*, 453-465.

<sup>17</sup> a) Guerrini, M.; Beccati, D.; Shriver, Z.; Naggi, A.; Viswanathan, K.; Bisio, A.; Capila, I.; Lansing, J. C.; Guglieri, S.; Fraser, B.; Al-Hakim, A.; Gunay, N. S.; Zhang, Z.; Robinson, L.; Buhse, L.; Nasr, M.; Woodcock, J.; Langer, R.; Venkataraman, G.; Linhardt, R. J.; Casu, B.; Torri, G.; Sasisekharan, R. *Nat. Biotech.* **2008**, *26*, 669-675; b) Liu, H.; Zhang, Z.; Linhardt, R. *J. Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 313-321.



**Figura 1.11.** Pentasacárido de heparina necesario para el proceso de anticoagulación.

### 1.2.5.2. Funciones biológicas del Sulfato de Condroitina (CS) y el Sulfato de Dermatano (DS)

Pese a que la heparina ha sido el GAG más estudiado históricamente desde el descubrimiento de esta familia de compuestos, en los últimos años se ha ampliado el foco de estudio al CS y al DS, ya que estos polisacáridos, presentes en la piel, los tendones, las válvulas cardíacas, el sistema nervioso central y los pulmones, juegan un papel fundamental en procesos biológicos tales como el crecimiento y la regeneración de las neuronas.<sup>18</sup>

Desde principios de este siglo, se ha desarrollado notablemente la investigación sobre estos carbohidratos, descubriendo y estudiando la multitud de funciones en las que se encuentran involucrados. El sulfato de dermatano, por ejemplo, actúa también como anticoagulante, al igual que la heparina, interaccionando con la AT-III.<sup>19</sup> El sulfato de condroitina participa

<sup>18</sup> Mizuguchi, S.; Uyama, T.; Kitagawa, H.; Nomura, K. H.; Dejima, K.; Gengyo-Ando, K.; Mitani, S.; Sugahara, K.; Nomura, K. *Nature* **2003**, 6938, 443-448.

<sup>19</sup> Pavão, M. S. G. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2002**, 74, 105-112.

en la generación de la dermis junto al quitosano y al colágeno,<sup>20</sup> en la formación de hidrogeles en ingeniería de tejidos,<sup>21</sup> en la osteoartritis,<sup>22</sup> y en la interacción con diversas proteínas, como los factores tróficos, llevando a cabo procesos relacionados con células neuronales.<sup>23</sup> De nuevo, es importante destacar que las interacciones con proteínas están mediadas por secuencias de CS específicas, responsables de las consiguientes funciones biológicas. Así, se ha demostrado que tetrasacáridos de CS tipo E se unen a determinados factores de crecimiento, modulando el desarrollo neuronal.<sup>23</sup>

### 1.2.5.3. Funciones biológicas del Ácido Hialurónico

Si tuviera que hablarse de un GAG diferente a los demás, éste sería el ácido hialurónico, ya que, al contrario del resto de compuestos de esta familia, éste no presenta sulfataciones o epimerizaciones a lo largo de su cadena. Además, el ácido hialurónico se presenta como un componente de alto peso molecular en la matriz extracelular sin estar unido a una proteína. Pese a sus diferencias con sus homólogos, este GAG se encuentra también involucrado en un elevado número de actividades biológicas.

Las funciones biológicas que llevan a cabo los polisacáridos de ácido hialurónico se encuentran relacionadas con la longitud de dichos azúcares y

---

<sup>20</sup> a) Damour, O.; Gueugniaud, P. Y.; Berthin-Maghit, M.; Rousselle, P.; Berthod, F.; Sahuc, F.; Collombel, C. *Clin. Mater.* **1994**, *15*, 273-276; b) Philandrianos, C.; Andrac-Meyer, L.; Mordon, S.; Feuerstein, J. M.; Sabatier, F.; Veran, J.; Magalon, G.; Casanova, D. *Burns* **2012**, *38*, 820-829.

<sup>21</sup> Kesti, M.; Müller, M.; Becher, J.; Schnabelrauch, M.; D'Este, M.; Eglin, D.; Zenobi-Wong, M. *Acta Biomater.* **2015**, *11*, 162-172.

<sup>22</sup> Henrotin, Y.; Marty, M.; Mobasheri, A. *Maturitas* **2014**, *78*, 184-187.

<sup>23</sup> Tully, S. E.; Mabon, R.; Gama, C. I.; Tsai, S. M.; Liu, X.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7736-7737.



la ubicación de la proteína con la que interaccionen. La importancia del tamaño puede observarse, por ejemplo, en la interacción con la proteína de membrana CD44 (clúster de diferenciación 44). Esta glicoproteína, presente en la membrana plasmática de las células, sirve como receptor de diversos componentes de la matriz extracelular, entre los que se encuentra el ácido hialurónico. La CD44 se expresa en un gran número de tipos celulares, pero se encuentra sobreexpresada principalmente en diversos tipos de tejidos tumorales.<sup>24</sup> Se ha comprobado que oligosacáridos de bajo peso molecular de ácido hialurónico interaccionan con CD44 de la superficie de células cancerosas, promoviendo así la migración celular de las mismas.<sup>25</sup> En cambio, cadenas de alto peso molecular de ácido hialurónico no son capaces de interaccionar con CD44, y por tanto, son incapaces de promover la migración de células tumorales. Hay estudios que indican que la longitud mínima de un oligosacárido de ácido hialurónico capaz de interaccionar con alta afinidad con CD44 es la de un octámero.<sup>26</sup>

Todo lo anterior pone de manifiesto que una familia de compuestos como es la de los GAGs, con una heterogeneidad fruto de la diversidad de carbohidratos y patrones de sulfatación y que además se encuentra involucrada en un sinnúmero de actividades biológicas, precisa de la investigación y el estudio minucioso de fragmentos oligosacáridicos con estructura y patrón de sulfatación bien definidos que permitan el análisis y el desarrollo potencial de las aplicaciones farmacológicas de estos productos. No

<sup>24</sup> Toole, B. P. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 528-539.

<sup>25</sup> Sugahara, K. N.; Murai, T.; Nishinakamura, H.; Kawashima, H.; Saya, H.; Miyasaka, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 32259-32265.

<sup>26</sup> Teriete, P.; Banerji, S.; Noble, M.; Blundell, C. D.; Wright, A. J.; Pickford, A. R.; Lowe, E.; Mahoney, D. J.; Tammi, M. I.; Kahmann, J. D.; Campbell, I. D.; Day, A. J.; Jackson, D. G. *Mol. Cell* **2004**, 13, 483-496.

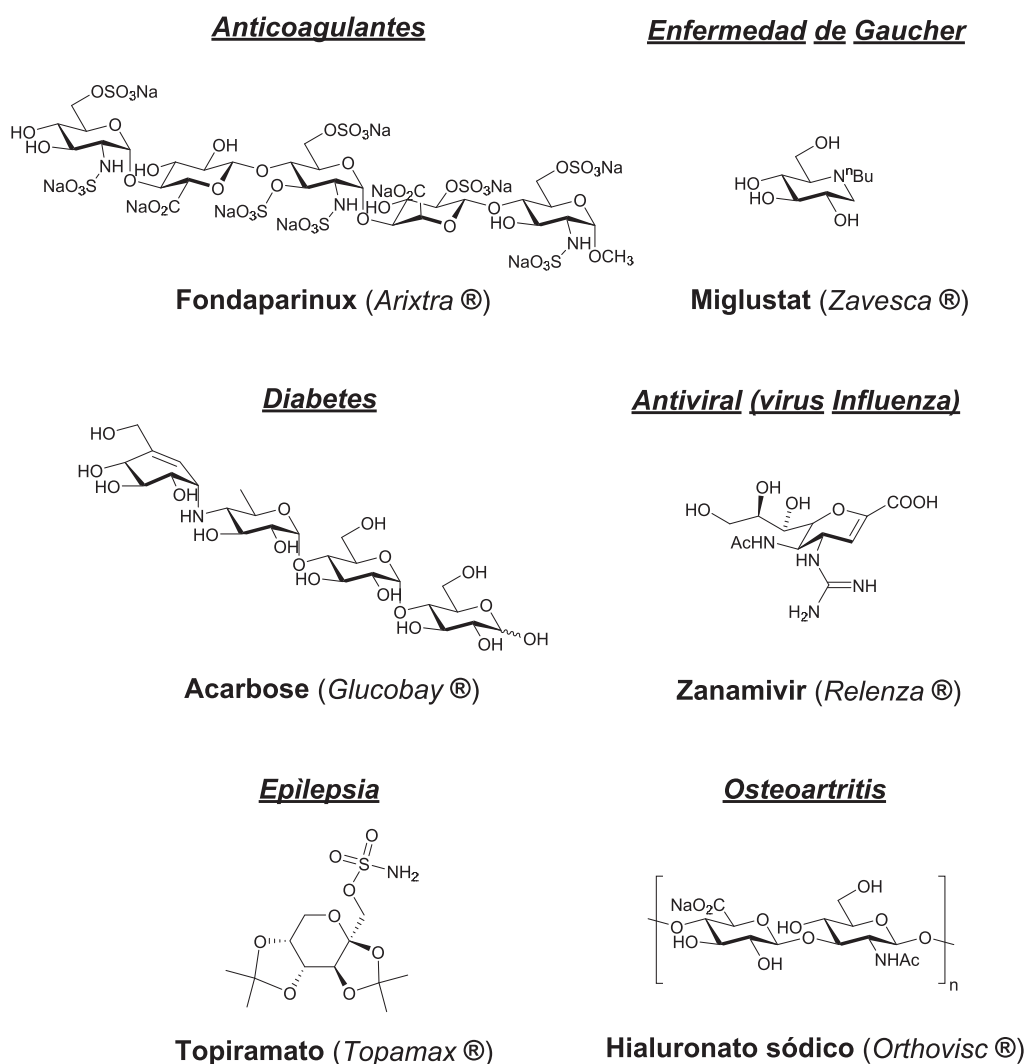
obstante, la obtención de estos compuestos mediante aislamiento desde fuentes naturales o a partir de métodos enzimáticos es altamente costosa, sin llegar a producir fragmentos de estructura controlada o suficientemente puros como para poder afirmar, sin lugar a dudas, los efectos de los mismos en el organismo. Todo ello le concede a la síntesis orgánica un papel protagonista a la hora de generar moléculas que imiten a los compuestos naturales, con estructuras y composición perfectamente regulares y conocidas, que sirvan como herramientas para discernir las diversas actividades que los GAGs tienen en los organismos vivos.

### **1.3. Glicomiméticos**

En ocasiones, la complejidad de los productos naturales hace imposible dilucidar las funciones de ciertas sustancias debido a su alto grado de heterogeneidad. La síntesis química se emplea para obtener miméticos de dichas sustancias que puedan servir como herramientas para el estudio de los compuestos naturales. Los carbohidratos constituyen la familia de biomoléculas más abundantes en la naturaleza, y las estructuras sintéticas que buscan imitarlos se denominan glicomiméticos. Dicho término es empleado para hacer referencia a compuestos sintéticos que tienen estructuras similares a los carbohidratos naturales, pero con alguna variación, de forma que sirvan como modelos de estudio.

Como se mencionó al principio de este capítulo, los azúcares que forman el glicocáliz de la superficie celular se encuentran involucrados en multitud de importantes procesos de reconocimiento. El desarrollo de glicomiméticos

sintéticos ha llevado al mercado multitud de medicamentos derivados de carbohidratos. (Figura 1.12)



**Figura 1.12.** Estructuras de glicomiméticos utilizados como medicamentos actualmente comercializados. El nombre en negrita es el principio activo, mientras que el nombre mostrado entre paréntesis hace referencia al nombre comercial registrado.

Entre los medicamentos mostrados en la figura anterior, se encuentra el Fondaparinux<sup>27</sup>, con efectos anticoagulantes, el Acarbose<sup>28</sup>, medicamento empleado para el tratamiento de la diabetes, el Miglustat<sup>29</sup>, sintetizado para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, el Zanamivir<sup>30</sup>, utilizado como antiviral frente al virus de la influenza y el Topiramato<sup>31</sup> y el Hialuronato sódico<sup>32</sup>, empleados para la epilepsia y la osteoartritis, respectivamente. Todos estos ejemplos muestran el potencial del empleo de glicomiméticos en la actualidad.<sup>33</sup>

### 1.3.1. Glicomiméticos de GAGs

Como vimos anteriormente, la heterogeneidad es la nota dominante en los GAGs. Para poder definir qué estructura oligosacáridica es la responsable de la interacción con una determinada proteína y de su correspondiente actividad biológica, es necesario disponer de fragmentos puros, de longitud y patrón de sulfatación definidos. La síntesis de oligosacáridos permite

---

<sup>27</sup> Petitou, M.; Duchaussoy, P.; Herbert, J. M.; Duc, G.; El-Haji, M.; Branellec, J. F.; Donat, F.; Necciari, J.; Cariou, R.; Bouthier, J.; Garrigou, E. *Semin. Thromb. Hemost.* **2002**, *28*, 393-402.

<sup>28</sup> Truscheit, E.; Frommer, W.; Junge, B.; Müller, L.; Schmidt, D. D.; Wingender, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1981**, *20*, 744-761.

<sup>29</sup> Weinreb, N. J.; Barranguer, J. A.; Charrow, J.; Grabowski, G. A.; Mankin, H. J.; Mistry, P. *Am. J. Hematol.* **2005**, *80*, 223-229.

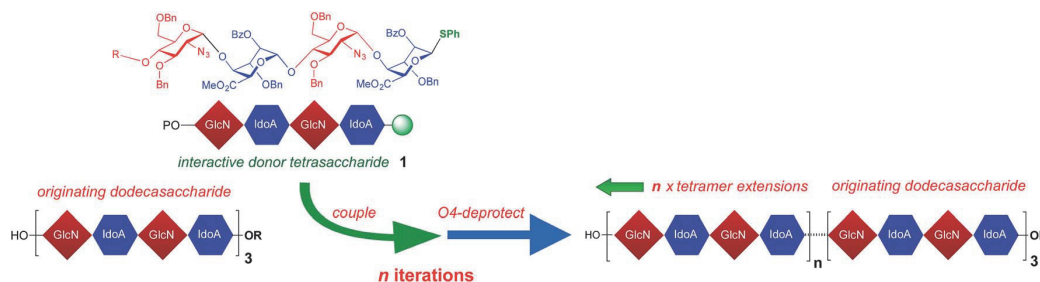
<sup>30</sup> Von Itzstein, M.; Wu, W. Y.; Kok, G. B.; Pegg, M. S.; Dyason, J. C.; Jin, B.; Van Phan, T.; Smythe, M. L.; White, H. F.; Oliver, S. W.; Colman, P. M.; Varghese, J. N.; Ryan, D. M.; Woods, J. M.; Bethell, R. C.; Hotham, V. J.; Cameron, J. M.; Penn, C. R. *Nature* **1993**, *363*, 418-423.

<sup>31</sup> Maryanoff, B. E.; Nortey, S. O.; Gardocki, J. F.; Shank, R. P.; Dodgson, S. P. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 880-887.

<sup>32</sup> Li, X.; Shah, A.; Franklin, P.; Merolli, R.; Bradley, J.; Busconi, B. *J. Orthop. Surg. Res.* **2008**, *3*, 43-50.

<sup>33</sup> Ernst, B.; Magnani, J. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 661-677.

obtener estas secuencias que mimetizan a los polisacáridos naturales.<sup>34</sup> Por ejemplo, el grupo de investigación del Prof. John M. Gardiner sintetizó oligosacáridos de heparina mediante elongación de la cadena utilizando como bloques de unión tetrasacáridos compuestos por GlcN-IdoA-GlcN-IdoA.<sup>35</sup> (Figura 1.13)



**Figura 1.13.** Estrategia de síntesis de oligosacáridos de heparina mediante elongación iterativa con reacciones de acoplamiento y desprotección de tetrasacáridos. Imagen extraída de “*Chem. Sci.* **2015**, *6*, 6158–6164.”

Por otra parte, en el año 2018, Pingsheng Lei y colaboradores llevaron a cabo la síntesis de oligosacáridos de CS-E empleando bloques disacarídicos convenientemente sustituidos para la obtención final de hexasacáridos de CS-E.<sup>36</sup>

Por lo tanto, el método iterativo de elongación de cadena es efectivo para la síntesis de oligosacáridos de estructura controlada y patrones de sulfatación definidos. Sin embargo, la síntesis de oligosacáridos precisa de un elevado número de etapas sintéticas y por lo tanto, de etapas de purificación, que implican tanto un alto coste en tiempo, como un descenso significativo del

<sup>34</sup> Mende, M.; Bednarek, C.; Wawryszyn, M.; Sauter, P.; Biskup, M. B.; Schepers, U.; Bräse, S. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 8193–8255.

<sup>35</sup> Hansen, S. U.; Miller, G. J.; Cliff, M. J.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 6158–6164.

<sup>36</sup> Yang, S.; Liu, Q.; Zhang, G.; Zhang, X.; Zhao, Z.; Lei, P. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 5897–5908.

rendimiento global. Cada etapa de crecimiento de la cadena precisa, al menos, de una reacción de desprotección del grupo hidroxilo que se pretende glicosidar, seguido de la correspondiente etapa de acoplamiento, para la unión de cada nuevo bloque. Conviene indicar, en este punto, que las secuencias GAGs biológicamente activas suelen tener por lo general un tamaño considerable, con al menos 6-8 unidades monosacáridas. Todo ello convierte la síntesis de oligosacáridos en un proceso complejo y muy costoso que suele implicar rendimientos globales bajos.

### 1.3.2. Glicomiméticos de GAGs multivalentes

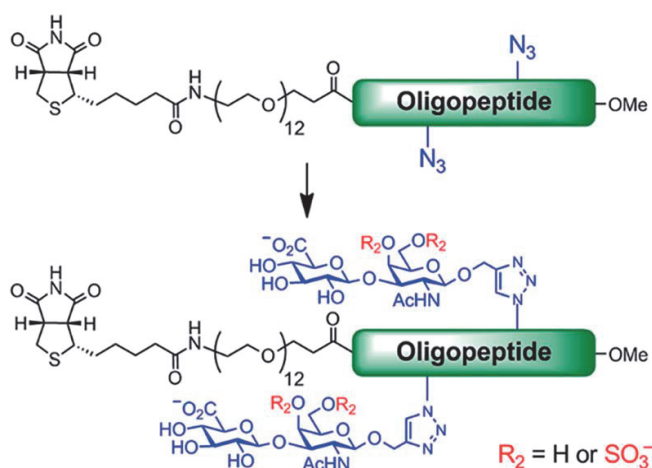
La preparación de sistemas multivalentes de GAGs es una alternativa muy atractiva a la síntesis iterativa de oligosacáridos. Para la generación de dichas estructuras, secuencias oligosacáridicas cortas (generalmente de 1 a 4 unidades), fácilmente sintetizables, se conjugan sobre un núcleo de diversa naturaleza. La disposición multivalente de los ligandos incrementa fuertemente su afinidad por los correspondientes receptores, al igual que ocurre en la naturaleza, debido al efecto multivalente.<sup>37</sup> Esta estrategia permite acceder, mucho más fácilmente que usando la síntesis de oligosacáridos, a sistemas complejos que pueden considerarse como miméticos de los polisacáridos naturales. A continuación, se presentarán los antecedentes existentes en la bibliografía de este tipo de estructuras.

---

<sup>37</sup> a) Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754-2794; b) Roy, R.; Murphy, P. V.; Gabius, H. J. *Molecules* **2016**, 21, 629-665.

### 1.3.2.1. Sistemas multivalentes de GAGs basados en oligopéptidos

Al inicio de la presente Tesis Doctoral, los antecedentes bibliográficos que implicaban la síntesis de sistemas multivalentes con GAGs, eran muy escasos. Durante el año 2015, Song-Gil Lee y colaboradores publicaron la síntesis de un glicomimético de CS, obtenido mediante la unión de unidades disacarídicas a un oligopéptido de poliprolinas funcionalizado químicamente para dicho propósito.<sup>38</sup> (Figura 1.14)



**Figura 1.14.** Estructura del oligopéptido mimético de CS. Imagen extraída de “*Chem. Sci.* **2015**, *6*, 450-456.”

Tras la síntesis de estos sistemas, que presentaban hasta 7 copias disacarídicas de CS, se llevaron a cabo estudios biológicos de interacción con el factor de crecimiento neuronal (NGF) en células, obteniéndose resultados prometedores.

<sup>38</sup> Liu, P.; Chen, L.; Toh, J. K. C.; Ang, Y. L.; Jee, J. E.; Lim, J.; Lee, S. S.; Lee, S. G. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 450-456.

### 1.3.2.2. Sistemas multivalentes de GAGs basados en polímeros

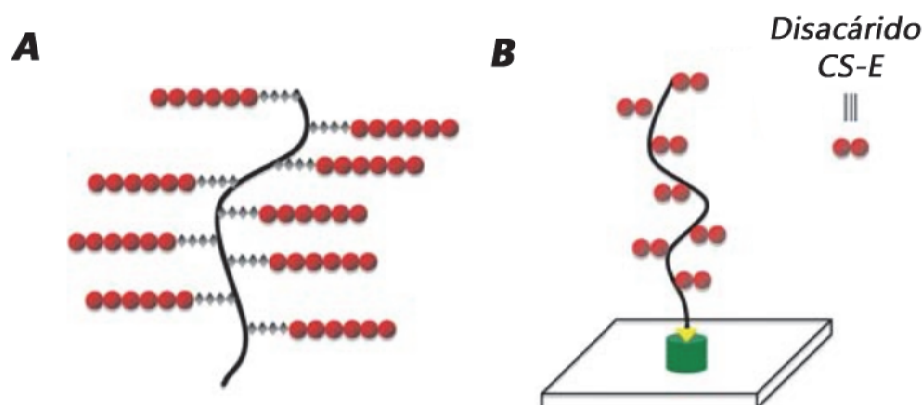
Otra aproximación para la preparación de sistemas multivalentes de GAGs consiste en la utilización de polímeros como esqueletos de las estructuras glicomiméticas. Esta estrategia fue explorada en el año 2008 por Linda C. Hsieh-Wilson y colaboradores,<sup>39</sup> que prepararon una serie de glicopolímeros utilizando unidades disacarídicas y tetrasacarídicas de CS. Dichos productos se emplearon para evaluar la inhibición de la extensión del hipocampo de las neuronas. Dos años después, en 2010,<sup>40</sup> este mismo grupo de investigación publicó otro trabajo en el cual se sintetizaban una serie de glicopolímeros de CS-E, esta vez funcionalizados en un extremo con biotina para poder inmovilizarlos en una superficie tratada con streptavidina, con el objetivo de mimetizar de forma más fiel la presentación de los GAGs en la superficie celular. (**Figura 1.15**)

---

<sup>39</sup> Rawat, M.; Gama, C. I.; Matson, J. B.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2959-2961.

<sup>40</sup> Lee, S. G.; Brown, J. M.; Rogers, C. J.; Matson, J. B.; Krishnamurthy, C.; Rawat, M.; Hsieh-Wilson, L. C. *Chem. Sci.* **2010**, *3*, 322-325.





**Figura 1.15.** A) Disposición de los GAGs en la membrana plasmática. B) Disposición de los disacáridos de CS-E de los glicopolímeros anclados a una superficie mediante una interacción biotina/streptavidina. Imagen extraída de “*Chem. Sci.* **2010**, 3, 322-325.”

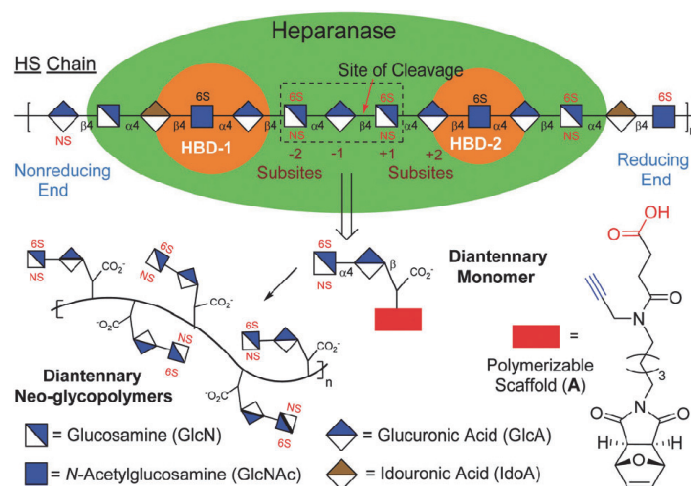
A lo largo del año 2013, la profesora Linda C. Hsieh-Wilson también publicó junto a sus colaboradores dos trabajos en los que empleaban los polímeros como plataforma para la presentación multivalente de heparina y HS. En el primero de dichos trabajos,<sup>41</sup> se sintetizaron disacáridos de heparina funcionalizados para que, mediante polimerización de olefinas cíclicas, formaran polímeros que presentaban entre 4 y 45 unidades de repetición disacarídica. Una vez sintetizados dichos glicomiméticos, se estudió su actividad anticoagulante midiendo la interacción frente a la proteína factor X de la coagulación (FXa), y se compararon los resultados con los obtenidos con el fármaco Arixtra (**Figura 1.12**) y con heparinas de bajo peso molecular. En el segundo trabajo,<sup>42</sup> se describió la síntesis de glicopolímeros empleando en este caso disacáridos de HS y heparina con distintos patrones

<sup>41</sup> Oh, Y. I.; Sheng, G. J.; Chang, S. K.; Hsieh-Wilson, L. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11796-11799.

<sup>42</sup> Sheng, G. J.; Oh, Y. I.; Chang, S. K.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 10898-10901.

de sulfatación como unidades de repetición y midiendo su actividad con la quimioquina proinflamatoria RANTES.

Durante 2017, el profesor Hien M. Nguyen y colaboradores publicaron otro trabajo basado en la utilización de polímeros como soportes para el desarrollo de estructuras glicomiméticas de GAGs.<sup>43</sup> En este caso, se imitaron las cadenas naturales de HS mediante la formación de unidades disacarídicas funcionalizadas con una olefina cíclica que por reacción de polimerización mediante metátesis de apertura de anillo (ROMP) dieron como resultado polímeros que presentaban entre 5 y 12 copias del ligando. La actividad de dichos sistemas se evaluó mediante ensayos de interacción con la enzima heparinasa. (**Figura 1.16**)



**Figura 1.16.** Representación esquemática de la enzima heparinasa y del diseño sintético de sus inhibidores. Imagen extraída de “*Chem. Commun.* **2017**, 53, 9163 – 9166.”

<sup>43</sup> Loka, R. S.; Yu, F.; Sletten, E. T.; Nguyen, H. M. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 9163 – 9166.

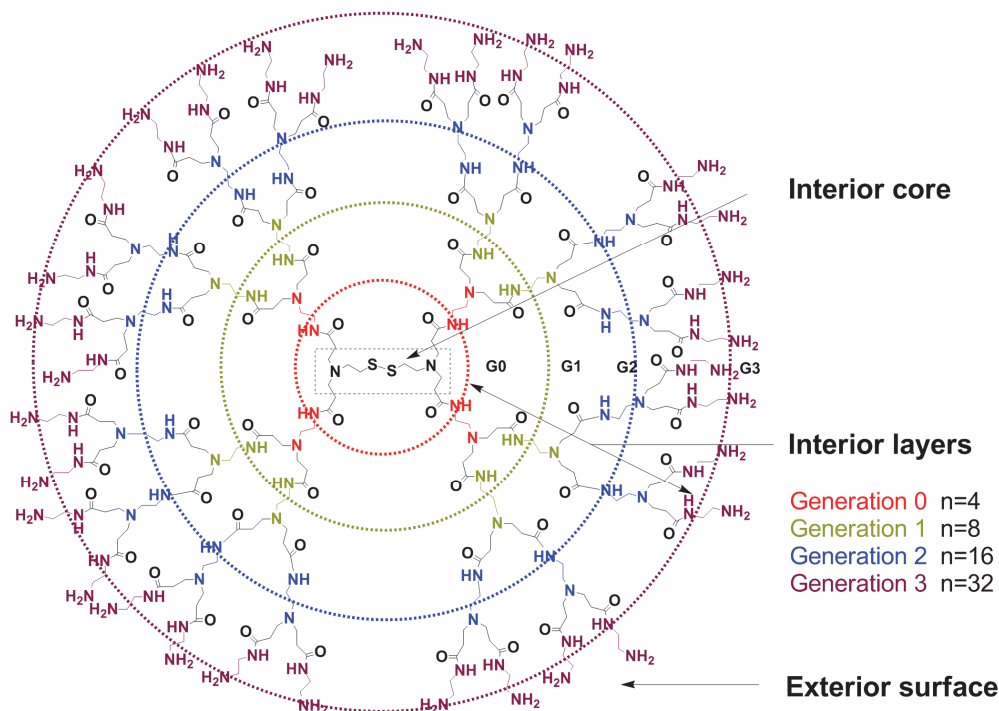
### 1.3.2.3. Sistemas multivalentes de GAGs basados en dendrímeros

Entre los diversos sistemas multivalentes que pueden encontrarse en la bibliografía, las estructuras dendriméricas permiten, a diferencia de otras plataformas multivalentes, la posibilidad de obtener sistemas monodispersos. Al inicio del presente proyecto de Tesis solo existían un par de referencias en la bibliografía sobre la obtención de dendrímeros con GAGs.

En el año 2007, el grupo del Profesor Peter H. Seeberger publicó el primer trabajo sobre la preparación de GAGs dendriméricos.<sup>44</sup> Para ello, se usaron como plataformas multivalentes dendrímeros PAMAM (poliamidoamina) disponibles comercialmente (**Figura 1.17**) que se funcionalizaron con oligosacáridos sintéticos de heparina mediante la formación de enlaces amida. Dichos compuestos se emplearon para estudiar la interacción con el factor de crecimiento para fibroblastos FGF-2.

---

<sup>44</sup> de Paz, J. L.; Noti, C.; Bohm, F.; Werner, S.; Seeberger, P. H. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 879-887.



**Figura 1.17.** Estructura con diferentes generaciones (0-4) del dendrímero PAMAM.

Más tarde, en el año 2015,<sup>45</sup> la doctora Olga V. Zubkova y colaboradores presentaron un trabajo en el que se sintetizaron disacáridos y tetrasacáridos de HS funcionalizados para poder llevar a cabo la conjugación con un núcleo dendrimérico tetravalente. Las estructuras generadas se emplearon en el estudio de la interacción con la proteasa BACE-1, enzima relacionada con el Alzheimer.

Durante el desarrollo de la presente Tesis aparecieron en la bibliografía un par de trabajos más acerca de la utilización de dendrímeros como glicomiméticos de GAGs por parte del profesor Zhongjun Li y

<sup>45</sup> Tyler, P. C.; Guimond, S. E.; Turnbull, J. E.; Zubkova, O. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 2718-2723.

colaboradores.<sup>46</sup> En dichos trabajos se sintetizó una batería de compuestos, a partir de un trisacárido de CS fucosilado y núcleos dendriméricos de 2, 3, 4, 6, 8 y 9 valencias, para posteriormente estudiar su actividad anticoagulante.

La presente Tesis Doctoral se centra en la síntesis de glicodendrimeros como miméticos del CS-E, por lo que en el siguiente apartado se discutirán en detalle las principales características de la estructura y preparación de este tipo de plataformas multivalentes.

## 1.4. Dendrímeros y dendrones

Dentro de las estructuras multivalentes empleadas en la síntesis orgánica a lo largo de los últimos años, la familia formada por dendrímeros y dendrones contiene unas características estructurales que les proporcionan una serie de singularidades fundamentales con respecto al resto de arquitecturas tipo.<sup>47</sup>

Los dendrímeros se caracterizan por tener una disposición tridimensional, que puede ser esférica (en función de la generación), que provoca el posicionamiento de los bloques de repetición en la superficie de dichas macroestructuras globulares. Ello permite una alta versatilidad y una elevada densidad superficial del motivo de repetición. La posibilidad de obtener estas moléculas discretas, mediante síntesis relativamente sencillas

---

<sup>46</sup> a) Zhang, X.; Yao, W.; Xu, X.; Sun, H.; Zhao, J.; Meng, X.; Wu, M.; Li, Z. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1694 – 1700; b) Liu, H.; Zhang, X.; Wu, M.; Li, Z. *Carb. Res.* **2018**, *467*, 45 – 51.

<sup>47</sup> a) Caminade, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 5174 – 5186; b) *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*, Eds. Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Vögtle, F., Wiley-VCH, **2001**, ISBN: 3527299971 / 9783527299973; c) *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, Eds. Cheng, Y.; Tomalia, D. A. Wiley, **2012**, ISBN: 978-0-470-46005-4.

y controlando el número de copias de repetición que se pueden disponer en superficie, hace que a partir de los años 90, el desarrollo de la investigación de este tipo de estructuras haya crecido de forma exponencial.<sup>48</sup>

Esquemáticamente, un dendrímero está compuesto por tres elementos estructurales. (**Figura 1.18**) El primero de ellos es el mismo centro del dendrímero, el núcleo desde donde crece tridimensionalmente. Dicha posición puede ser ocupada por una multitud de tipos estructurales, desde derivados bencénicos<sup>49</sup>, pasando por porfirinas<sup>50</sup> y llegando incluso a la utilización de fullerenos<sup>51</sup>, mostrando así el amplio abanico de posibilidades para su empleo en diversos campos. El segundo de los elementos que conforma a un dendrímero es el nodo, conocido como el punto de ramificación a partir del cual se crea una nueva generación. Por último, el tercer elemento estructural está constituido por los grupos terminales expuestos en la superficie de la macromolécula globular. La cantidad de grupos terminales dependerá de la generación del dendrímero y de la valencia de su núcleo.

---

<sup>48</sup> a) Matthews, O. A.; Shipway, A. N.; Stoddart, J. F. *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23*, 1-56; b) Rojo, J.; Delgado, R. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 579-581; c) Svenson, S.; Tomalia, D. A. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 2106-2129; d) Rojo, J.; Delgado, R. *Anti-Infec. Agents Med. Chem.* **2007**, *6*, 151-174; e) Rojo, J. *Anti-Infec. Agents Med. Chem.* **2009**, *8*, 50-72; f) Konkolewicz, D.; Monteiro, M. J.; Perrier, S. *Macromolecules* **2011**, *44*, 7067-7087; g) Sowinska, M.; Urbanczyk-Lipkowska, Z. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 2168-2203; h) Caminade, A. M.; Ouali, A.; Laurent, R.; Turrin, C. O.; Majoral, J. P. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3890-3899; i) Salvadó, M.; Reina, J. J.; Rojo, J.; Castellón, S.; Boutureira, O. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 15790-15794; j) Kageyama, A.; Yanase, M.; Yuguchi, Y. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *204*, 104-110.

<sup>49</sup> Füstös, M. E.; Sipos, T. A.; Diudea, M. V.; Katona, G. *Croat. Chem. Acta* **2015**, *88*, 129-132.

<sup>50</sup> Akisada, M.; Kimura, R.; Tachi, Y.; Suzuki, S.; Okada, K.; Kozaki, M. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 9631-9640.

<sup>51</sup> Muñoz, A.; Sigwalt, D.; Illescas, B. M.; Luczkowiak, J.; Rodríguez-Pérez, L.; Nierengarten, I.; Holler, M.; Remy, J. S.; Buffet, K.; Vincent, S. P.; Rojo, J.; Delgado, R.; Nierengarten, J. F.; Martin, N. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 50-57.



**Figura 1.18.** Representación esquemática de un dendrímero (a) y de un dendrón (b).

Imagen extraída de: "An. Quím. **2009**, 105, 103-110."

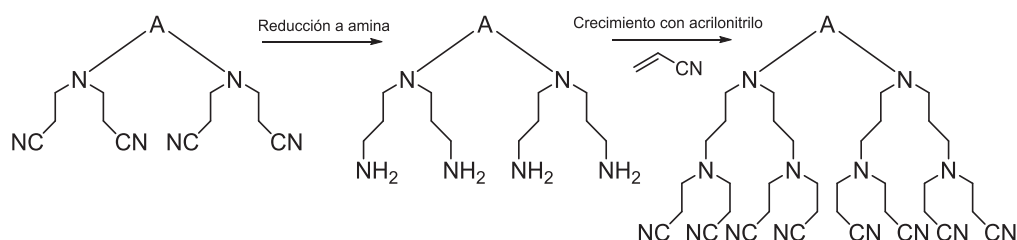
El término dendrón es empleado para referirse a moléculas discretas ramificadas que crecen solo en una dirección cónica del espacio. (**Figura 1.18**) En otras palabras, los dendrones pueden ser considerados como las partes constituyentes de los dendrímeros. Cuando varios dendrones se unen a un núcleo generan un dendrímero. La principal diferencia entre ellos radica en que los dendrones disponen de una posición focal a partir de la cual crecen, como se mencionó anteriormente, en una dirección concreta.

#### 1.4.1. Síntesis de dendrímeros

La obtención de este tipo de compuestos se lleva a cabo a través de la realización de una serie de etapas sintéticas consecutivas, mediante las cuales se va ampliando la generación del dendrímero. Estas reacciones dan lugar a una serie de compuestos monodispersos, con estructuras perfectamente definidas. Para la preparación de esta clase de compuestos

se precisa que las etapas sintéticas consecutivas estén basadas en reacciones selectivas con rendimientos altos.

La síntesis de la primera estructura dendrítica fue publicada en el año 1978 por Vögtle y colaboradores.<sup>52</sup> En dicho trabajo se describía la síntesis de esta familia de compuestos mediante reacciones en cascada con acrilonitrilo y posterior reducción a amina. (**Figura 1.19**)



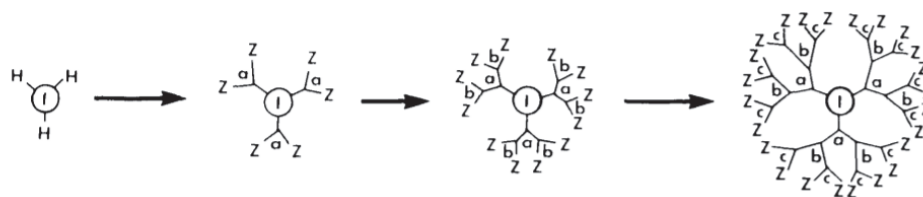
**Figura 1.19.** Representación esquemática de las reacciones en cascada descritas por Vögtle, donde A representa diaminas alquílicas.

Posteriormente, en 1985, Tomalia y colaboradores describieron la síntesis de dendrímeros que bautizaron con el término de “estallido de estrellas poliméricas”.<sup>53</sup> (**Figura 1.20**) Para obtener dichas estructuras se partía de amoníaco como núcleo central, el cual se hacía reaccionar con acrilato de metilo, obteniendo la primera generación. A partir de este paso, mediante reacciones consecutivas con etilendiamina y acrilato de metilo se iban generando las sucesivas generaciones del dendrímero. Esta metodología de trabajo sirvió para la obtención de la familia de dendrímeros PAMAM, mencionado anteriormente.

<sup>52</sup> Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. *Synthesis* **1978**, 155-158.

<sup>53</sup> Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, 17, 117-132.



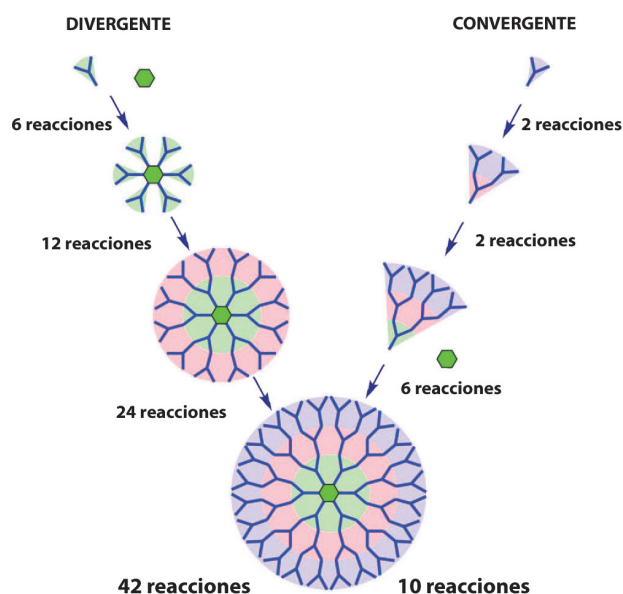


**Figura 1.20.** Representación esquemática del crecimiento de los dendrímeros generados por Tomalia y colaboradores, donde a, b y c, representan las generaciones del dendrímero.

Imagen extraída de: "*Polym. J.* **1985**, 17, 117-132."

Existe un amplio abanico de estrategias sintéticas para llevar a cabo la formación de estas peculiares estructuras, pero todas ellas, tanto para la obtención de dendrones como de dendrímeros, pueden agruparse en dos aproximaciones denominadas síntesis divergente y síntesis convergente.

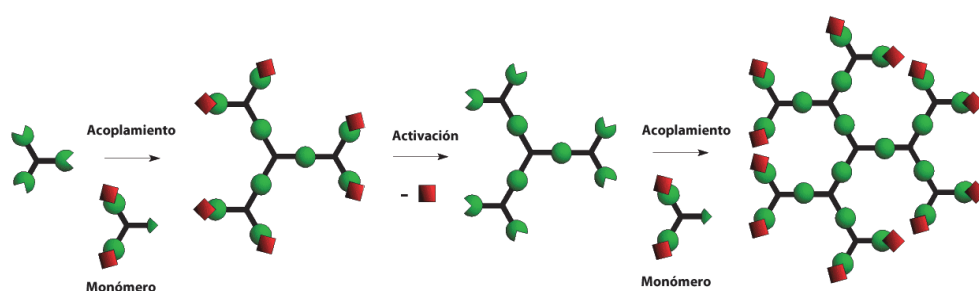
(Figura 1.21)



**Figura 1.21.** Estrategias divergente y convergente para la síntesis de dendrímeros. Imagen extraída de: "*Chem. Rev.* **2009**, 109, 6275-6540."

### 1.4.1.1. Síntesis divergente

Para llevar a cabo la síntesis divergente de un dendrímero es necesario comenzar desde el núcleo y construir la estructura hacia el exterior, es decir, realizar reacciones superficiales iterativas donde en cada etapa va creciendo la generación de la molécula. Mediante la utilización de este método se precisan, tal y como se puede ver en la **Figura 1.21**, un número mayor de reacciones en cada etapa de formación, lo que conduce a la posibilidad de la aparición de defectos estructurales, especialmente en las generaciones altas del dendrímero. Para el crecimiento en capas, es necesario que las reacciones estén diseñadas para ser selectivas únicamente en uno de los extremos de las moléculas que se acoplan al núcleo ya formado, evitando así procesos de polimerización y generando moléculas discretas con crecimiento controlado. A continuación, se debe llevar a cabo una etapa de activación o desprotección que permita la nueva adhesión de moléculas mediante acoplamiento para obtener una nueva generación, como se puede observar en la **Figura 1.22**. De esta forma, cada ciclo de crecimiento generacional incluye dos etapas de reacción consistentes en una primera etapa de acoplamiento, seguida de una segunda etapa de activación.

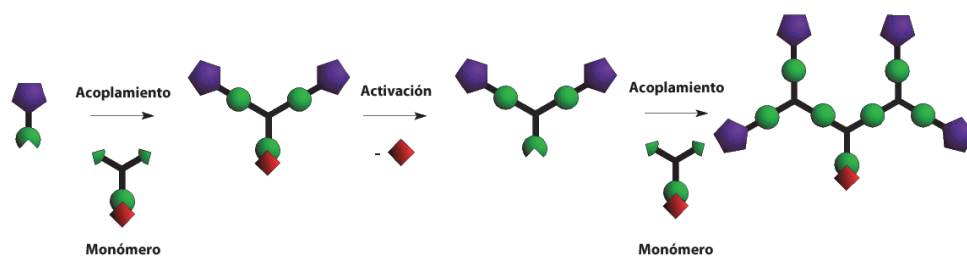


**Figura 1.22.** Esquema de síntesis divergente de dendrímeros. Imagen extraída de: “*Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819-3868.”

La principal ventaja del método de síntesis divergente reside en la elevada posibilidad de automatización sintética. Esta metodología, de hecho, es la que se aplica para la síntesis de compuestos tales como el PAMAM disponible comercialmente. En cuanto a las desventajas de la utilización de este método, se encuentra la elevada cantidad de reacciones que se precisan en la síntesis de dendrímeros de generación elevada. Si unimos esto a la posibilidad de la obtención de moléculas en las que no todos los nodos han reaccionado y la dificultad de purificación en sistemas con tanta similitud podemos concluir que la estrategia divergente resulta problemática para la obtención de generaciones altas de estructuras dendriméricas.

#### 1.4.1.2. Síntesis convergente

La síntesis convergente supone un cambio radical de estrategia a la hora de obtener los dendrímeros, empezando la síntesis desde la periferia de la macromolécula y llegando finalmente hasta el centro de la misma. Para ello, esta metodología se basa en la síntesis de dendrones cada vez mayores que finalmente se anclan, en una última etapa, a un núcleo multivalente. (**Figura 1.23**) Como vimos anteriormente en la **Figura 1.21**, la síntesis convergente precisa una formación menor de enlaces por etapa para llegar al dendrímero objetivo. Al bajar el número de acoplamientos en cada etapa, se disminuye también la probabilidad de la aparición de reacciones incompletas, en comparación con la síntesis divergente.



**Figura 1.23.** Esquema de síntesis convergente de dendrímeros. Imagen extraída de: “*Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819-3868.”

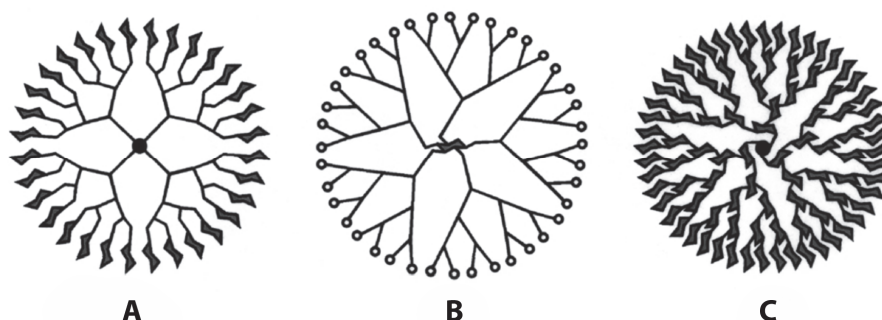
Ya que la cantidad de grupos funcionales que reaccionan en cada etapa es menor en la síntesis convergente, se produce también una disminución en la probabilidad de la aparición de compuestos que no han reaccionado completamente. Esto provoca un descenso de la polidispersión y conlleva una mejor obtención de moléculas discretas. Además, se facilita la purificación de los dendrones o los dendrímeros finales ya que las diferencias en el tamaño molecular son significativas, permitiendo así el empleo de un mayor abanico de posibilidades de purificación. No obstante, este tipo de síntesis se limita habitualmente a la obtención de dendrímeros de baja generación, ya que el impedimento estérico se va incrementado al aumentar el tamaño de los dendrones, provocando un aumento en la ineficiencia de las reacciones.<sup>54</sup>

### 1.4.2. Glicodendrímeros

Como se ha mostrado anteriormente, los dendrímeros son una de las mejores opciones disponibles en la actualidad para poder llevar a cabo

<sup>54</sup> Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819-3868.

miméticos de polisacáridos naturales. El término glicodendrímtero acoge a todas aquellas estructuras dendríticas que poseen carbohidratos en su composición. Pero como se ha definido anteriormente, la estructura de un dendrímtero está compuesta por un núcleo en su centro espacial, una serie de nodos que aumentan la generación del mismo, y las unidades de repetición del exterior. Por lo tanto, existirían tres categorías de glicodendrímteros en función del posicionamiento de los carbohidratos. (Figura 1.24)



**Figura 1.24.** Tipos de glicodendrímteros: A) Funcionalización superficial de carbohidratos; B) Utilización de carbohidratos como núcleo de crecimiento; C) Constitución única de carbohidratos

Estos pueden encontrarse en la superficie de la molécula como grupos de repetición; (Figura 1.24A) pueden ser utilizados como núcleo del dendrímtero; (Figura 1.24B) o pueden ser empleados en la constitución de la totalidad del dendrímtero, como nodos, núcleo y grupos superficiales.<sup>55</sup> (Figura 1.24C)

<sup>55</sup> a) Bezouška, K. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 90, 269-290; b) Roy, R. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, 15, 291-310; c) Pieters, R. J. *Drug Discov. Today: Technol.* **2009**, 6, e27-e31; d) Nanjwade, B. K.; Bechra, H. M.; Derkar, G. K.; Manvi, F. V.; Nanjwade, V. K. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, 38, 185-196.

En los últimos años, se ha desarrollado con una mayor amplitud la química relacionada con la obtención de glicodendrimeros del tipo A de la **Figura 1.24**, como herramientas para llevar a cabo estudios de reconocimiento carbohidrato-proteína.<sup>56</sup> La presente Tesis Doctoral también se centra en la preparación de este tipo de glicodendrimeros. La utilización de estos compuestos se hace muy interesante ya que pueden obtenerse moléculas con muchas copias de cualquier tipo de carbohidrato formando una estructura monodispersa. Además, el diseño de estas moléculas puede ajustarse a las exigencias del receptor, y permite comparar dichos sistemas con ligandos monovalentes.

Todo lo mencionado anteriormente pone de manifiesto las numerosas ventajas tanto sintéticas como estructurales que la familia de los dendrimeros posee para ser seleccionada como una herramienta prometedora en la síntesis de glicomiméticos de azúcares naturales con una complejidad tal como los GAGs. Además, diversas estrategias de síntesis, tanto divergente como convergente, posibilitan la obtención de macromoléculas monodispersas, escalables y de estructura conocida.

---

<sup>56</sup> Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 525-561.

## CAPÍTULO 2.

### **OBJETIVOS.**





## **2. Objetivos**

Como hemos podido comprobar en el capítulo anterior, los carbohidratos presentes en el glicocáliz de las células animales juegan un papel fundamental en la interacción de éstas con su entorno. Dicho papel convierte a los carbohidratos en gestores de multitud de funciones biológicas.

Los GAGs presentes en los proteoglicanos de la membrana celular, llevan a cabo muchas de estas funciones, convirtiéndose en una diana de estudio muy importante. Pese a que históricamente el protagonismo de esta familia de compuestos ha recaído sobre la heparina, durante los últimos años se ha observado un auge en la investigación relacionada con el resto de integrantes de la familia de los GAGs, como el sulfato de condroitina, polisacárido en el que se centra esta Tesis y que está implicado en el desarrollo del sistema nervioso central, entre otros procesos. La investigación acerca del papel que estos carbohidratos tienen en las funciones biológicas con las que están relacionadas, se convierte en una ardua tarea debido a la gran heterogeneidad de estos polisacáridos naturales, lo que dificulta la obtención de fragmentos oligosacáridicos de alta pureza. Tanto la síntesis enzimática como la extracción a partir de productos naturales se convierten en procesos inviables debido a los altos costes y a la dificultad para obtener sustancias monodispersas y de estructura definida. En este contexto la química orgánica sintética cobra un papel fundamental para desarrollar herramientas que puedan ser empleadas en el estudio de las diversas interacciones de los GAGs con proteínas. Así, en esta Tesis Doctoral se consideró la preparación de glicomiméticos que imitaran las estructuras del polisacárido natural y que se

pudieran obtener en el laboratorio más fácilmente que los oligosacáridos lineales. Concretamente, se decidió sintetizar estructuras multivalentes de naturaleza dendrímica que presentaran múltiples copias de un ligando disacárido de CS-E. Estos sistemas cuentan con ventajas respecto al resto de estructuras multivalentes, tales como la posibilidad de llegar a estructuras monodispersas que dispongan de un elevado número de unidades de repetición en su superficie, mimetizando así a los polisacáridos naturales.

Por lo tanto, el objetivo fundamental de la presente Tesis es abordar la síntesis de glicodendrimeros como miméticos de las cadenas polisacáridicas de GAGs, para ser empleados como herramientas con las que poder llevar a cabo estudios de interacciones carbohidrato-proteína mediante diferentes técnicas. Para conseguir dicho objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo y optimización de una nueva ruta sintética diseñada para la obtención de un disacárido modelo de sulfato de condroitina con un patrón de sulfatación del tipo E, funcionalizado adecuadamente para poder ser utilizado como motivo de repetición en estructuras dendrímicas.
- Síntesis de glicodendrones y glicodendrimeros como miméticos de los polisacáridos naturales de sulfato de condroitina de tipo E. Empleando el disacárido sintetizado anteriormente como motivo de repetición y utilizando diferentes núcleos, se generarán estructuras con distinta

valencia que se usarán para estudiar los efectos de la multivalencia en interacciones carbohidrato-proteína.

- Estudio de las interacciones entre los glicomiméticos obtenidos y proteínas tales como el factor de crecimiento Midkina y la lectina Langerina mediante diferentes métodos: polarización de fluorescencia, resonancia del plasmón de superficie (SPR), RMN y MALDI-ToF.



## **CAPÍTULO 3.**

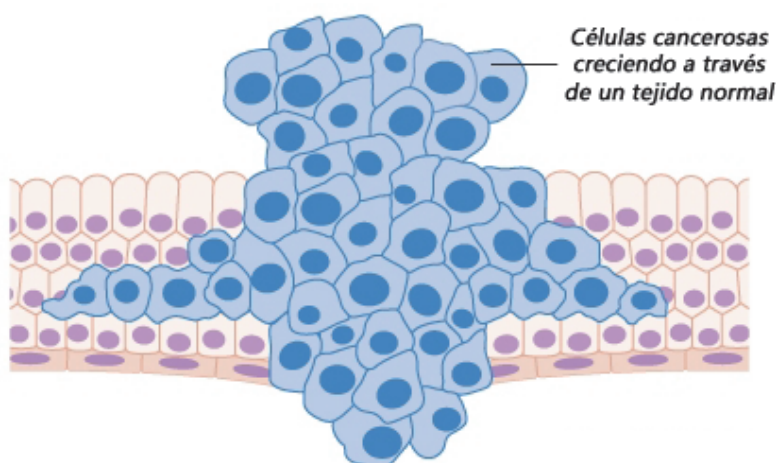
# **SINTESIS DE DENDRÍMEROS DE 1<sup>a</sup> GENERACIÓN COMO GLICOMIMÉTICOS DEL CS-E Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON LA MIDKINA.**



## 3.1. Introducción

### 3.1.1 Cáncer y factores de crecimiento

El cáncer o los procesos cancerosos son los nombres comunes que reciben un conjunto de enfermedades relacionadas en las que se observa un proceso sin control en la división de las células de diversos tejidos. Este crecimiento celular sin restricción viene acompañado de la aparición de masas anormales en los diversos tejidos que carecen de funcionalidad y que habitualmente pueden diferenciarse entre tumores malignos o benignos, (**Figura 3.1**) utilizándose este último término cuando se encuentran dichos tumores cubiertos por una cápsula fibrosa que no permite que se extiendan a otras partes del cuerpo, evitando consecuencias graves para el organismo.



**Figura 3.1.** Proceso sin control de crecimiento celular. Imagen extraída de la web:

<https://www.pinterest.es>

En la actualidad este conjunto de enfermedades afecta a un alto porcentaje de la población. Muchos factores que están popularmente asociados a la

aparición del cáncer han sufrido un crecimiento exponencial en las últimas décadas. Efectos tales como el aumento de la contaminación ambiental, el crecimiento cada vez mayor de la población mundial y su consecuente cambio en el modelo alimenticio, el agujero cada vez mayor de la capa de ozono y el aumento de exposición a radiaciones solares, entre otros, son algunos ejemplos de factores que podrían explicar el acuciante aumento de personas que sufren en la actualidad dicha enfermedad.

A lo largo de la historia se ha ido avanzando cada vez más en el conocimiento sobre las causas y los factores que contribuyen al desarrollo de dicho conjunto de enfermedades. Un hito en este campo tuvo lugar en 1948, cuando la investigadora Rita Levi-Montalcini descubrió el factor de crecimiento nervioso (NGF), hecho que la llevó a recibir el premio Nobel de Medicina en 1986 junto al investigador Stanley Cohen. Este descubrimiento supuso un paso adelante en la investigación contra el cáncer, ya que en la actualidad se conoce que estas familias de proteínas se encuentran relacionadas estrechamente con los procesos cancerígenos, ya que son responsables de la regulación de la proliferación celular.

#### **3.1.2. Factores de crecimiento. Midkina**

Los factores de crecimiento o “factores tróficos”, son un conjunto de sustancias de naturaleza proteica, capaces de actuar incluso en concentraciones muy bajas y que desempeñan importantes funciones en la comunicación celular, tales como: estimular la proliferación celular mediante la regulación de la mitosis;<sup>57</sup> mantener la supervivencia de las

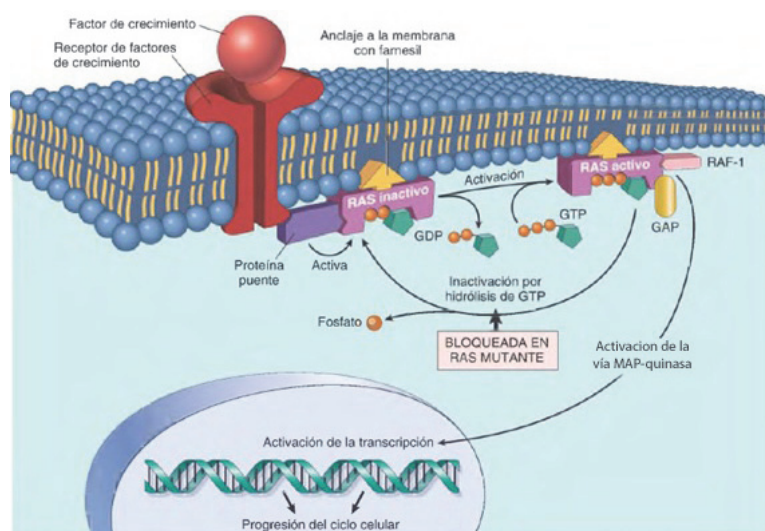
---

<sup>57</sup> Hirschhorn, T.; Barizilay, L.; Smorodinsky, N. I.; Ehrlich, M. *PLoS ONE* **2018**, 7, e43459.



células;<sup>58</sup> estimular la migración y la diferenciación celular, e incluso la inhibición de la apoptosis;<sup>59</sup> siendo la actividad principal, el control externo del ciclo celular.

Estas sustancias son sintetizadas por un gran número de células como mediadores frente a diversos estímulos. Los factores de crecimiento no funcionan como enzimas, sino como señalizadores intercelulares de la membrana plasmática. El mecanismo de acción comienza al unirse a dicha proteína un receptor celular específico externo de la membrana, que a su vez activa a un segundo mensajero en el que interviene una proteína tirosina fosfatasa, que desencadena una transmisión de la señal en el interior celular. (Figura 3.2)

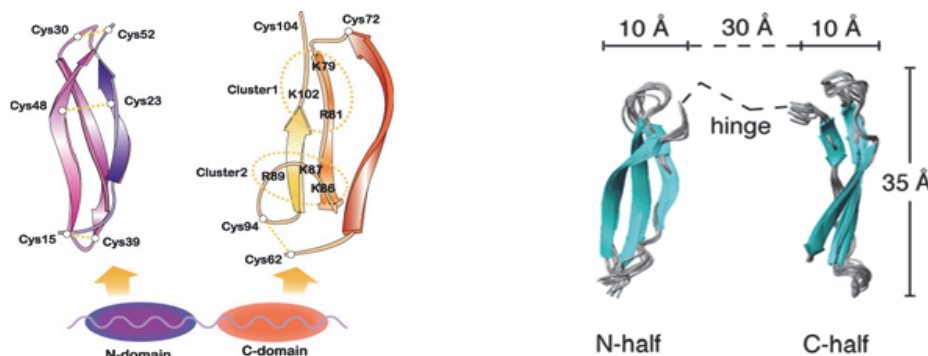


**Figura 3.2.** Representación esquemática del mecanismo de acción de los factores de crecimiento en las células. Imagen extraída del libro *“Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Health Sciences, **2009**”

<sup>58</sup> Tanaka, K.; Watanabe, M.; Matsushima, M.; Matsuzawa, Y.; Izawa, T.; Nagashima, T.; Kobayashi, Y.; Iwashita, M. *Growth Horm. IGF Res.* **2018**, *41*, 34-41.

<sup>59</sup> Ozturk, A. M.; Sozbilen, M. C.; Sevgili, E.; Dagcy, T.; Özyalcin, H.; Armagan, G. *Injury* **2018**, *49*, 1038-1045.

Los factores tróficos se clasifican en familias de proteínas relacionadas estructuralmente. La Midkina junto a la Pleiotrofina, también llamada HB-GAM, constituyen una de estas familias.<sup>60</sup> La Midkina es una citoquina que interacciona con heparina y que promueve el desarrollo, la migración y la supervivencia de un gran número de tipos de células.<sup>61</sup> Es una proteína básica, no glicosilada, con un peso molecular de unos 13kDa, compuesta principalmente por dos dominios mantenidos por puentes disulfuro.<sup>62, 63</sup>



**Figura 3.3.** Representaciones estructurales de la Midkina. Figura extraída del artículo científico "*Biochem. J.* **2013**, 451, 407-415".

Cada dominio contiene 3 láminas beta plegadas antiparalelas. **(Figura 3.3)** El dominio ubicado en el extremo C terminal es el responsable de la actividad de la Midkina. Dicha proteína participa en numerosos procesos biológicos tales como la adhesión neuronal, el crecimiento y migración celular y juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central. Cabe

<sup>60</sup> a) Deuel, T. F.; Zhang, N.; Yeh, H. J.; Silos-Santiago, I.; Wang, Z. Y. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 397, 162-171; b) Rauvala, H.; Peng, H. B. *Prog. Neurobiol.* **1997**, 52, 127-144.

<sup>61</sup> a) Muramatsu, T. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, 17, 410-423; b) Kadomatsu, K.; Kishida, S.; Tsubota, S. *J. Biochem.* **2013**, 153, 511-521.

<sup>62</sup> Fabri, L.; Maruta, H.; Muramatsu, H.; Muramatsu, T.; Simpson, R. J.; Burgess, A. W.; Nice, E. C. *J. Chromatogr.* **1993**, 646, 213-225.

<sup>63</sup> Lim, J.; Yao, S.; Graf, M.; Winkler, C.; Yang, D. *Biochem. J.* **2013**, 451, 407-415.

destacar la alta expresión de esta proteína durante las etapas embrionarias. No obstante, en adultos sanos se expresa únicamente en tejidos dañados, participando así en el proceso de reparación. Como contrapartida, también son significativos los altos niveles de Midkina en tejidos cancerosos, ya que su sobreexpresión se encuentra asociada con el crecimiento tumoral y la angiogénesis.<sup>64</sup> (Tabla 3.1)

Tipos de tumores	General	Relación con el pronóstico	Objetivo de terapia
<b>Carcinoma oral de células escamosas</b>	Ruan <i>et al.</i> 2007	Ruan <i>et al.</i> 2007	
<b>Carcinoma de esófago</b>	Aridome <i>et al.</i> 1995		
<b>Carcinoma gástrico</b>	Aridome <i>et al.</i> 1995		
<b>Carcinoma de colon</b>	Aridome <i>et al.</i> 1995		Takei <i>et al.</i> 2001
<b>Carcinoma hepatocelular</b>	Aridome <i>et al.</i> 1995		Dai <i>et al.</i> 2009
<b>Carcinoma pancreático</b>	Maeda <i>et al.</i> 2007	Maeda <i>et al.</i> 2007	
<b>Carcinoma pulmonar</b>	Garver <i>et al.</i> 1993		
<b>Carcinoma de vejiga urinaria</b>	O'Brien <i>et al.</i> 1996	O'Brien <i>et al.</i> 1996	
<b>Carcinoma de próstata</b>	Konishi <i>et al.</i> 1999	Konishi <i>et al.</i> 1999	Takei <i>et al.</i> 2006
<b>Carcinoma de mama</b>	Garver <i>et al.</i> 1994		
<b>Carcinoma uterino</b>	Moon <i>et al.</i> 2003, Tanabe <i>et al.</i> 2008	Tanabe <i>et al.</i> 2008	Tanabe <i>et al.</i> 2008
<b>Carcinoma de ovario</b>	Nakanishi <i>et al.</i> 1997		
<b>Osteosarcoma</b>	Maehara <i>et al.</i> 2007		Maehara <i>et al.</i> 2007
<b>Sarcoma de tejidos blandos</b>	Jin <i>et al.</i> 2008		Jin <i>et al.</i> 2008

<sup>64</sup> Muramatsu, T. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2010**, 86, 410–425.

<b>Neuroblastoma</b>	Nakagawara <i>et al.</i> 1995	Nakagawara <i>et al.</i> 1995
<b>Astrocitoma</b>	Mishima <i>et al.</i> 1997	Mishima <i>et al.</i> 1997
<b>Meningioma</b>	Tong <i>et al.</i> 2007	
<b>Leucemia linfoblástica infantil</b>	Hidaka <i>et al.</i> 2007	
<b>Tumor de Wilms</b>	Tsutsui <i>et al.</i> 1993	
<b>Tumor maligno de la vaina del nervio periférico</b>	Mashour <i>et al.</i> 2001	

**Tabla 3.1.** Tipos de tumores humanos en los que se ha demostrado la sobreexpresión de la Midkina hasta el año 2010. Tabla extraída de: “*Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2010**, *86*, 410–425”

La actividad biológica de esta proteína está atrayendo mucha atención en relación con el valor potencial para el tratamiento de enfermedades como el cáncer,<sup>65</sup> la artritis reumatoide,<sup>66</sup> la esclerosis múltiple,<sup>67</sup> la hipertensión,<sup>68</sup> o procesos neurodegenerativos tales como el Alzheimer o el Parkinson<sup>69</sup>. Por todas estas razones, la Midkina se ha convertido en una diana muy atractiva para el desarrollo de nuevos fármacos frente a dichos procesos patológicos.

<sup>65</sup> Takei, Y.; Kadomatsu, K.; Matsuo, S.; Itoh, H.; Nakazawa, K.; Kubota, S.; Muramatsu, T. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8486-8491.

<sup>66</sup> Maruyama, K.; Muramatsu, H.; Ishiguro, N.; Muramatsu, T. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 1420-1429.

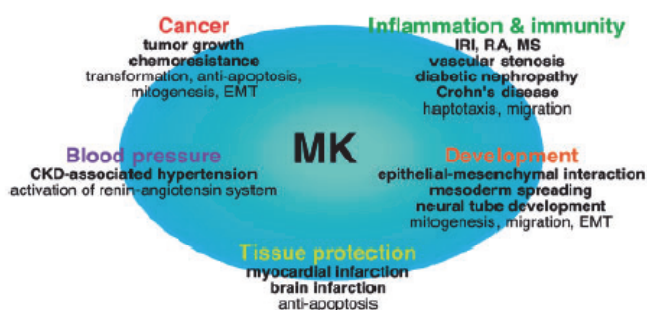
<sup>67</sup> Wang, J.; Takeuchi, H.; Sonobe, Y.; Jin, S.; Mizuno, T.; Miyakawa, S.; Fujiwara, M.; Nakamura, Y.; Kato, T.; Muramatsu, H.; Muramatsu, T.; Suzumura, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3915-3920.

<sup>68</sup> Hobo, A.; Yuzawa, Y.; Kosugi, T.; Kato, N.; Asai, N.; Sato, W.; Maruyama, S.; Ito, Y.; Kobori, H.; Ikematsu, S.; Nishiyama, A.; Matsuo, S.; Kadomatsu, K. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 1616-1625.

<sup>69</sup> Prediger, R.D.; Rojas-Mayorquin, A. E.; Aguiar, A. S.; Chevarin, C.; Mongeau, R.; Hamon, M.; Lanfumey, L.; Del Bel, E.; Muramatsu, H.; Courty, J.; Raisman-Vozary, R. *J. Neural Transm.* **2011**, *118*, 1215-1225.

Como curiosidad decir que, el conocimiento popular de las posibilidades de esta proteína, le han llevado incluso a la gran pantalla como co-protagonista de la película japonesa “L: Change the World”, encuadrada en el aclamado anime japonés de ciencia ficción “Death note”. En dicha película los altos niveles de Midkina en el cuerpo de un niño lo inmunizan ante un virus y gracias al estudio de esta proteína se genera una cura frente a dicho virus.

Los fenómenos biológicos en los que esta proteína participa pueden ser clasificados en 5 áreas: a) cáncer, b) inmunidad/inflamación, c) presión sanguínea, d) desarrollo celular, e) protección de tejidos. (**Figura 3.4**)



**Figura 3.4.** Fenómenos biológicos en los que está involucrada la Midkina. Se muestran los fenómenos representativos de sus funciones *in vivo* (en negrita) y relacionados con su actividad *in vitro*. CKD, enfermedad renal crónica; EMT, transición mesenquimal-epitelial; IRI, lesión por isquemia-reperfusión; MS, esclerosis múltiple; RA, artritis reumatoide. Imagen extraída de: “*J. Biochem.* **2013**, *153*, 511–521.”

Hasta el momento, no ha sido posible determinar si un solo receptor transmembrana (**Figura 3.2**) es capaz de explicar la acción de este factor de crecimiento. Pero se sabe que los complejos de algunos receptores podrían formarse dependiendo del contexto celular y podrían mediar en la señalización de la Midkina.

Entre los principales complejos receptores de este factor de crecimiento se encuentra el proteoglicano tirosina fosfatasa transmembrana cuyo dominio

extracelular posee cadenas de sulfato de condroitina. Por lo tanto, se cree que carbohidratos de tipo GAG pueden modular la actividad de la Midkina.

De hecho, el sulfato de condroitina (CS) y en particular, el sulfato de condroitina de tipo E (CS-E), interaccionan fuertemente con distintos factores de crecimiento, como la Midkina<sup>70</sup>, con valores de constante de disociación en el rango nanomolar.<sup>71</sup> La interacción entre CS y Midkina es dependiente del patrón de sulfatación de las cadenas y se ha demostrado que una disposición específica de grupos sulfato con el motivo CS-E (GlcA - GalNAc 4,6-di-OSO<sub>3</sub>) es necesaria para dicha unión.<sup>72</sup>

El interés farmacológico de la Midkina y la posibilidad de modular sus actividades biológicas relacionadas con los procesos de crecimiento celular sin control asociados al cáncer, justifican el interés de estudiar de forma exhaustiva las interacciones entre los GAGs y este factor de crecimiento. Todo ello, con el fin último de desarrollar moléculas capaces de interferir en estas interacciones, controlando los procesos de crecimiento celular mediados por Midkina.

Para ello, tal y como se expuso en el capítulo 2 de la presente Tesis, se abordó la síntesis de glicodendrimeros que contienen disacáridos de CS-E como glicomiméticos del polisacárido natural, para el posterior estudio de sus interacciones con Midkina.

---

<sup>70</sup> a) Solera, C.; Macchione, G.; Maza, S.; Kayser, M. M.; Corzana, F.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 2356-2369; b) de Paz, J. L.; Nieto, P. M. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 3506-3509.

<sup>71</sup> a) Deepa, S. S.; Umehara, Y.; Higashiyama, S.; Itoh, N.; Sugahara, K. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 43707-43716; b) Zou, P.; Zou, K.; Muramatsu, H.; Ichihara-Tanaka, K.; Habuchi, O.; Ohtake, S.; Ikematsu, S.; Sakuma, S.; Muramatsu, T. *Glycobiology* **2003**, 13, 35-42.

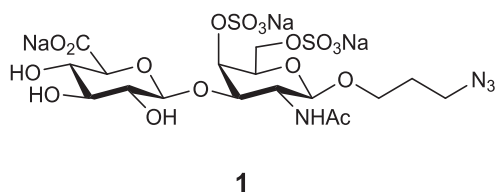
<sup>72</sup> Ueoka, C.; Kaneda, N.; Okazaki, I.; Nandanaka, S.; Muramatsu, T.; Sugahara, K. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 37407-37413.

## 3.2. Resultados y discusión

### 3.2.1. Síntesis del disacárido (GlcA-GalNAc 4,6-di-OSO<sub>3</sub>) de repetición

Para mimetizar los polisacáridos naturales se planeó una estrategia de síntesis de estructuras multivalentes mediante química “Click”, en la que se emplearía como unidad de repetición el disacárido GlcA-GalNAc 4,6-di-OSO<sub>3</sub>, correspondiente a la estructura del CS-E, pero funcionalizado adecuadamente en su posición anomérica para unirse a núcleos con distinta valencia y naturaleza.

De esta forma, se llevó a cabo la síntesis del bloque de repetición **1** (Figura 3.5) que será utilizado para la formación de los correspondientes glicodendrímeros.

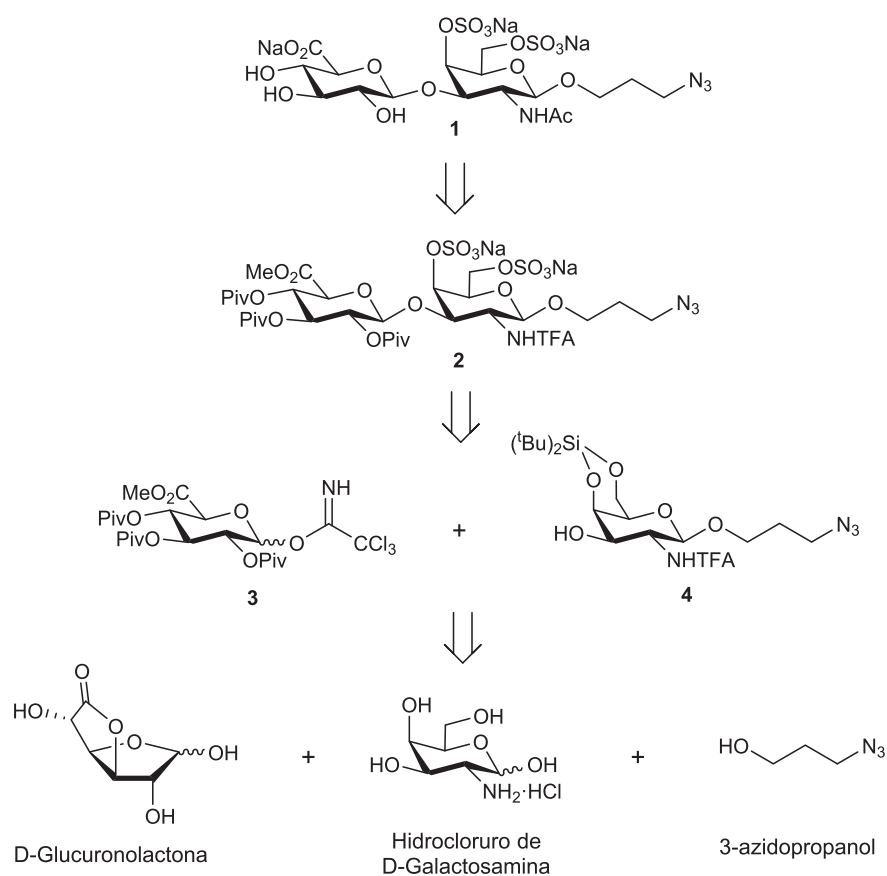


**Figura 3.5.** Disacárido GlcA-GalNAc 4,6-di-O-sulfatado de repetición **1**, mimético del CS-E.

Para obtener este disacárido, se desarrolló y se puso a punto una ruta sintética consistente en 15 etapas de reacción que se describen a continuación.

La preparación de disacáridos de CS con un patrón de sulfatación del tipo E requiere de la preparación previa de bloques de galactosamina y ácido

glucurónico, protegidos de forma que sea posible su ensamblaje. (**Figura 3.6**)

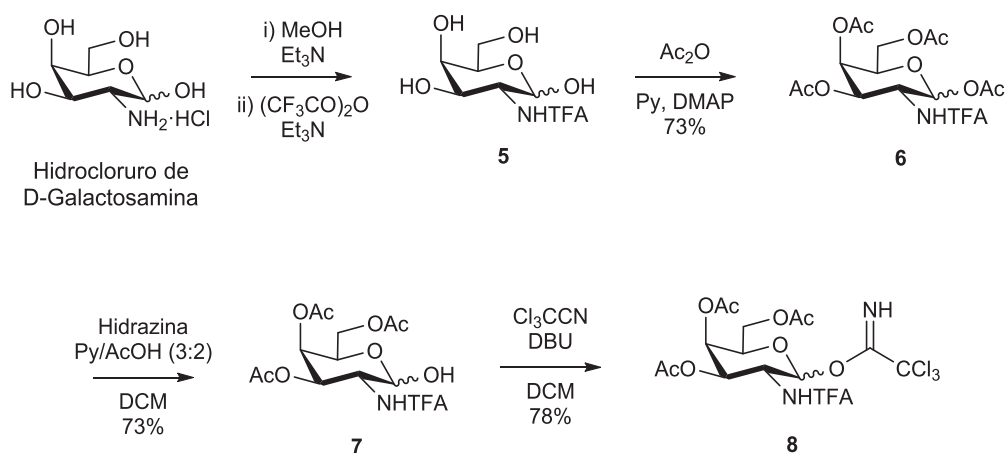


**Figura 3.6.** Esquema retrosintético para la preparación del disacárido de repetición **1**.

Se comenzó con la preparación del bloque de galactosamina. Para ello, se partió del hidrócloruro de D-galactosamina, reactivo comercial, cuyo grupo amino se desprotegió mediante el empleo de una base como la trietilamina



para, a continuación, llevar a cabo su acilación selectiva con anhídrido trifluoroacético.<sup>73</sup> (**Figura 3.7**)



**Figura 3.7.** Síntesis del donador de galactosamina **8**.

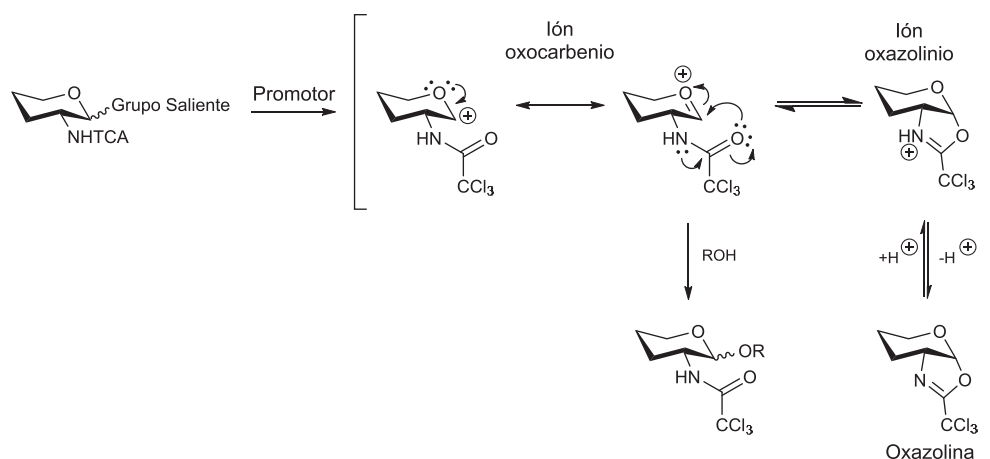
El empleo de este grupo protector no es casual. Tanto el grupo *N*-trifluoroacetilo como el grupo *N*-tricloraacetilo conducen a la formación estereoselectiva del enlace 1,2 transglicosídico. Sin embargo, el empleo de *N*-tricloraacetilo como grupo protector no está exento de problemas. Por ejemplo, tanto en nuestro grupo de investigación,<sup>74</sup> como en otros,<sup>75</sup> se ha detectado la formación de oxazolinias estables durante las reacciones de glicosidación. (**Figura 3.8**) Este hecho fue motivo suficiente para la utilización de un grupo protector del grupo amino alternativo para la síntesis de la unidad de repetición. En este sentido, se eligió el grupo *N*-trifluoroacetilo debido a su capacidad para ser fácilmente eliminado mediante el empleo de condiciones suaves de reacción y a su idoneidad, ya

<sup>73</sup> a) Wolfrom, M. L.; Coniglia, P. J. *Carbohydr. Res.* **1969**, *11*, 63–76; b) Maza, S.; Kayser, M. M.; Macchione, G.; Lopez-Prados, J.; Angulo, J.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *21*, 3510-3525.

<sup>74</sup> Macchione, G.; Maza, S.; Kayser, M. M.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *18*, 3868-3884.

<sup>75</sup> Lu, X. W.; Kamat, M. N.; Huang, L. J.; Huang, X. F. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7608–7617.

que garantiza una elevada formación del enlace anomérico beta en las reacciones de glicosidación, evitando al mismo tiempo la formación de oxazolininas estables.<sup>76</sup>



**Figura 3.8.** Esquema del mecanismo de formación de triclorooxazolininas.

A continuación, y sin necesidad de purificar el monosacárido trifluoroacetilado **5**, se llevó a cabo la protección de todos los grupos hidroxilo libres mediante una acetilación exhaustiva de la molécula. Para ello, se utilizó una mezcla de anhídrido acético-piridina obteniendo así el derivado **6** que, en este caso, sí precisa de una etapa de purificación mediante cromatografía en gel de sílice.

En la siguiente etapa sintética, se desprotegió el grupo OH de la posición anomérica, reacción que se llevó a cabo mediante el empleo de hidrazina monohidrato. Una vez preparado el compuesto **7**, éste se hizo reaccionar bajo atmósfera inerte con tricloroacetoniitrilo en presencia de una cantidad catalítica de DBU para obtener el donador de glicosilo **8**.

<sup>76</sup> Bongat, A. F. G.; Demchenko, A. V. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 374–406.

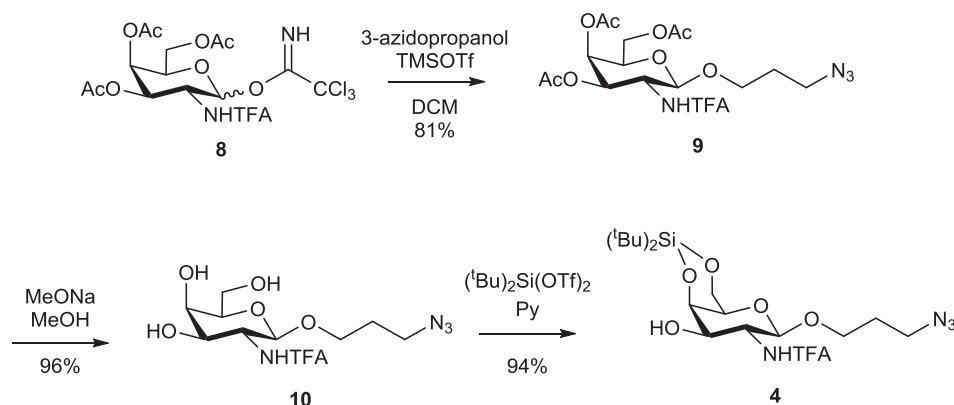
La siguiente etapa consistió en la introducción de un espaciador en la posición anomérica. (**Figura 3.9**) Para ello, el compuesto **8** se glicosiló con 3-azidopropanol en presencia de triflato de trimetilsililo (TMSOTf) para dar el monosacárido **9** que, de esta forma, dispone de un espaciador adecuadamente funcionalizado para su posterior conjugación con los alquinos terminales de los núcleos dendríticos. La utilización del grupo protector *N*-trifluoroacetilo permitió la formación selectiva y con elevado rendimiento del enlace 1,2-*trans* glicosídico con el espaciador azido, sin detectarse la formación de oxazolininas.

Una vez obtenida la unidad monosacarídica funcionalizada en su posición anomérica, se desprotegieron los grupos OH de la *N*-trifluoroacetilgalactosamina, mediante una hidrólisis, utilizando las condiciones clásicas de Zemplen<sup>77</sup> que consisten en el empleo de metóxido sódico en metanol, dando lugar al derivado **10** con un alto rendimiento.

Posteriormente, se preparó el compuesto **4** introduciendo un grupo silileno cíclico en las posiciones 4 y 6 de la galactosamina, empleando para ello triflato de di-*tert*-butilsililo como reactivo. De esta forma, el grupo OH de la posición 3 de la galactosamina permanece desprotegido y listo para la glicosidación con el monosacárido derivado del ácido glucurónico.

---

<sup>77</sup> Zemplen, G.; Kunz, A. *Ber.* **1924**, 57b, 1357-1359.

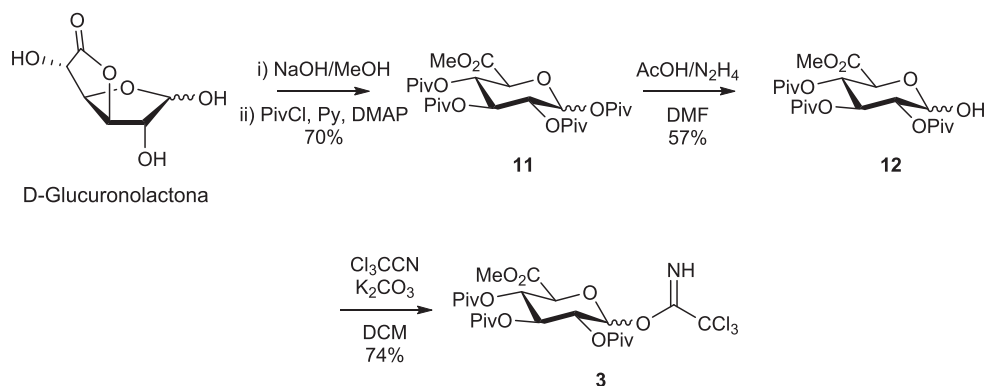


**Figura 3.9.** Reacción de glicosidación con el espaciador funcionalizado con azida y posterior síntesis del aceptor de glicosilo **4**.

Una vez obtenido el aceptor de glicosilo **4**, se comenzó con la síntesis del otro sintón del disacárido, el donador de glicosilo **3**, cuya preparación se llevó a cabo siguiendo las condiciones de reacción recogidas en la bibliografía<sup>78</sup> con ligeras modificaciones. (**Figura 3.10**) En primer lugar, se partió de la D-glucuronolactona, que se trató con NaOH en metanol para producir la hidrólisis del éster cíclico y la consiguiente formación del éster metílico. Posteriormente, se protegieron exhaustivamente los hidroxilos utilizando pivaloilos como grupos protectores. Para ello, se empleó cloruro de pivaloilo en piridina y DMAP como catalizador, obteniendo así el compuesto **11**. A continuación, se desprotegió el grupo OH de la posición anomérica utilizando acetato de hidrazinio generado *in situ*, mediante el empleo de cantidades equimolares de ácido acético e hidrazina monohidrato en DMF, dando como resultado el compuesto **12**. Por último, se llevó a cabo la formación del tricloroacetimidato **3**. Inicialmente, se trató de disminuir la cantidad de equivalentes de carbonato potásico empleados

<sup>78</sup> a) Harding, J. R.; King, C. D.; Perrie, J. A.; Sinnott, D.; Stachulski, A. V. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1501-1507; b) Vlahov, J.; Snatzke, G. *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 4, 570-574.

en la reacción, pero tras varios ensayos, se observó que el exceso de carbonato potásico (7 equivalentes) era necesario para dar lugar al compuesto **3** con buen rendimiento.

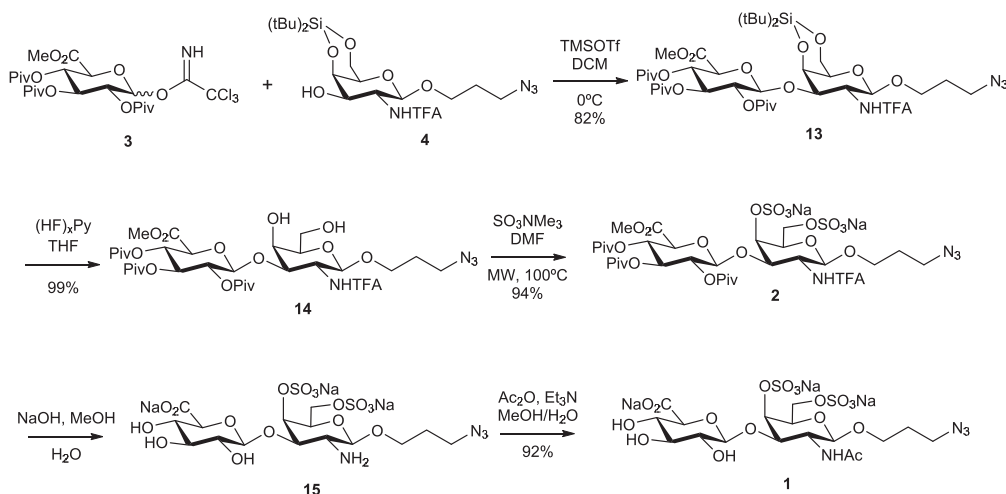


**Figura 3.10.** Síntesis de la unidad donadora de glicosilo **3**.

Una vez obtenidos los dos sintones **3** y **4**, necesarios para la síntesis del disacárido, se llevó a cabo la glicosidación entre ambos. Dicha reacción se realizó usando triflato de trimetilsililo como catalizador, dando lugar al disacárido **13** con buenos rendimientos. (**Figura 3.11**) La siguiente etapa de reacción consistió en la desprotección de los grupos OH de las posiciones 4 y 6 de la galactosamina, mediante el uso del complejo (HF)<sub>x</sub>·Py en THF, obteniendo así el compuesto **14**. Dichos grupos OH fueron sometidos a sulfatación empleando SO<sub>3</sub>·NMe<sub>3</sub> y utilizando calefacción por microondas (100 °C), para obtener el compuesto **2**. En esta reacción cabe destacar el exceso de reactivo de sulfatación empleado, ya que se usaron 10 equivalentes de SO<sub>3</sub>·NMe<sub>3</sub> por cada grupo OH,<sup>79</sup> duplicando e incluso cuádruplicando la cantidad de reactivo de sulfatación, en comparación con

<sup>79</sup> Maza, S.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 441-443.

otros casos descritos en la bibliografía.<sup>80</sup> De esta forma pueden asegurarse rendimientos altos, evitando la formación de compuestos parcialmente sulfatados.

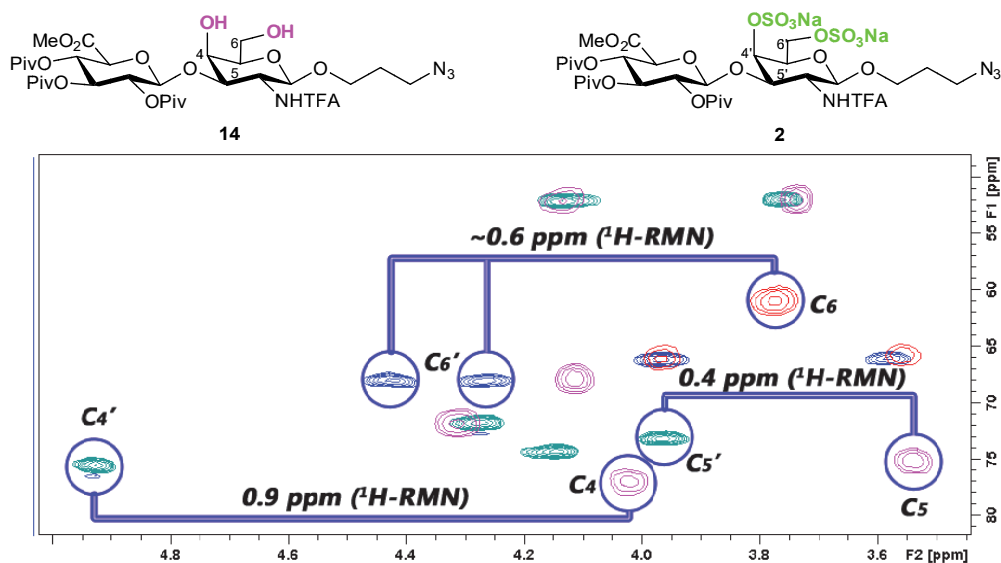


**Figura 3.11.** Síntesis de la unidad disacáridica mimética de CS-E, **1**.

La sulfatación de los grupos hidroxilos pudo confirmarse fácilmente mediante resonancia magnética nuclear (RMN). En el espectro bidimensional de RMN protón-carbono HSQC (correlación heteronuclear de nivel cuántico individual), se observa un desplazamiento muy significativo a campo bajo de las señales correspondientes a los protones de las posiciones 4, 5 y 6 de la unidad de galactosamina. (**Figura 3.12**) El protón 4, pasa de un desplazamiento químico de 4.04 ppm en el caso del compuesto **14** a 4.94 ppm en el compuesto **2**. También, se observa que la señal del protón 5 pasa de 3.54 a 3.97 ppm y la del 6, pasa de un desplazamiento a 3.77 ppm a una señal desdoblada que diferencia los dos protones del carbono 6 a 4.42 y 4.26 ppm.

<sup>80</sup> a) Krylov, V. B.; Ustyuzhanina, N. E.; Grachev, A. A.; Nifantiev, N. E. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5877–5879; b) Al-Horani, R. A.; Desai, U. R. *Tetrahedron* **2010**, 66, 2907–2918.

*Síntesis de dendrímeros de 1ª generación como glicomiméticos del CS-E y estudios de interacción con la Midkina*



**Figura 3.12.** Superposición de los espectros de HSQC de los disacáridos **14** y **2**, donde se observan las señales correspondientes a **2** en verde y azul y las correspondientes a **14** en rosa y rojo.

Por último, una vez obtenido el compuesto sulfatado **2**, se llevó a cabo la desprotección de los grupos pivaloilo, del éster metílico y del *N*-trifluoroacetilo, mediante hidrólisis básica en NaOH 2M, para dar lugar al intermedio **15**. Finalmente, se realizó una *N*-acetilación selectiva para obtener el disacárido **1**, con un patrón de sulfatación característico del CS-E, funcionalizado con un grupo azida que permite la posterior conjugación con los núcleos dendriméricos.

### 3.2.2. Síntesis de los núcleos dendriméricos 16, 17 y 18

Para poder llevar a cabo la preparación de los glicodendrimeros de primera generación fue necesario previamente sintetizar los soportes dendriméricos, convenientemente funcionalizados, que permitan la conjugación de nuestro disacárido de repetición. Para ello, se llevó a cabo la síntesis de 3 núcleos dendriméricos diferentes con 3, 4 y 6 grupos alquino, respectivamente. **(Figura 3.13)**

El núcleo de 3 alquinos está constituido por un benceno sustituido en las posiciones 1, 3 y 5, mientras que los núcleos de 4 y 6 alquinos fueron preparados a partir del pentaeritritol y el bispentaeritritol, respectivamente, todos ellos comerciales. Estos núcleos fueron seleccionados para poder estudiar la influencia que la valencia y la naturaleza del soporte pudieran tener en el reconocimiento molecular. La preparación de estos núcleos fue descrita previamente por nuestro grupo de investigación.<sup>81</sup>

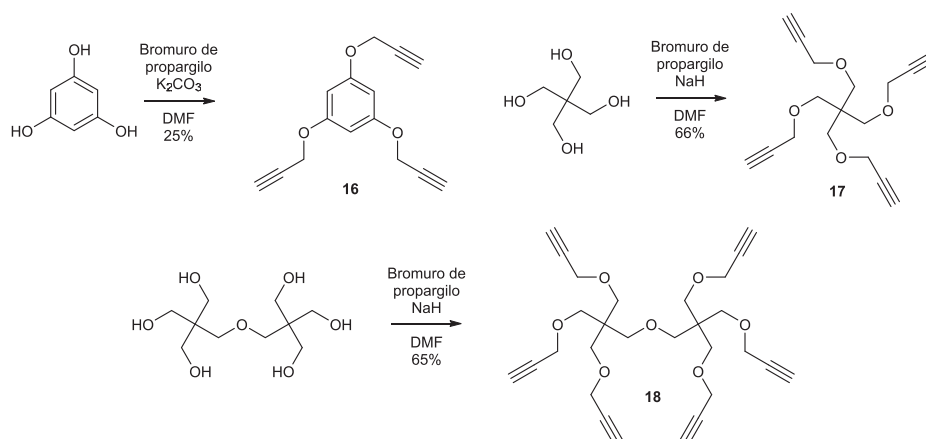
Los soportes dendriméricos con grupos alquino se obtuvieron a partir de los alcoholes comerciales correspondientes, por tratamiento con un leve exceso de bromuro de propargilo en DMF y utilizando como base carbonato potásico (para el sistema trivalente **16**) o hidruro sódico (para los compuestos **17** y **18**).

---

<sup>81</sup> Varga, N.; Sutkeviciute, I.; Ribeiro-Viana, R.; Berzi, A.; Ramdasi, R.; Daggetti, A.; Vettoretti, G.; Amara, A.; Clerici, M.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Biomaterials* **2014**, 35, 4175-4184.



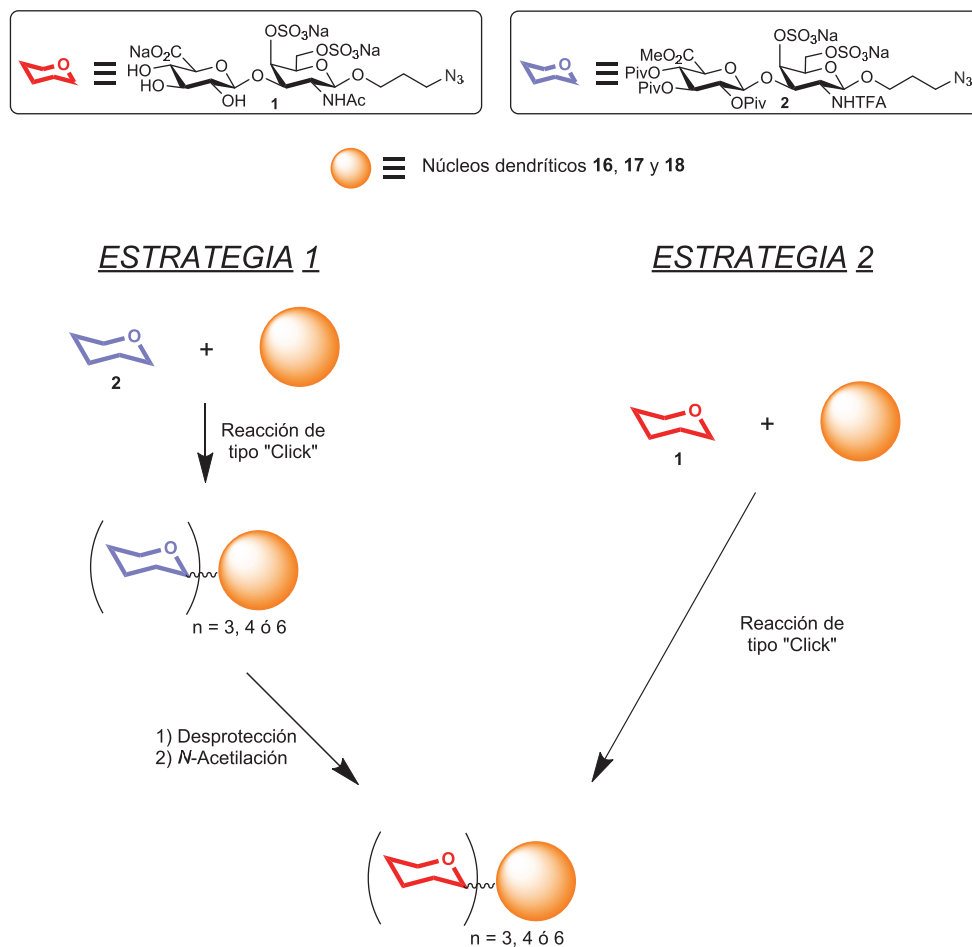
*Síntesis de dendrímeros de 1ª generación como glicomiméticos del CS-E y estudios de interacción con la Midkina*



**Figura 3.13.** Síntesis de los núcleos dendriméricos **16**, **17** y **18** a partir de alcoholes comerciales.

### 3.2.3. Formación de los glicodendrimeros 19 - 24

Para llevar a cabo la conjugación del disacárido mimético de CS y las estructuras dendriméricas, se plantearon dos estrategias distintas. (**Figura 3.14**) La primera de ellas implicaba la utilización del intermedio protegido **2** para llevar a cabo la reacción de conjugación, seguida de una segunda etapa de desprotección, para dar los glicodendrimeros objetivo. La segunda estrategia consistía en la cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I) con el compuesto desprotegido **1** y los núcleos dendriméricos, asumiendo la dificultad inherente de este tipo de acoplamientos con compuestos desprotegidos altamente polares.

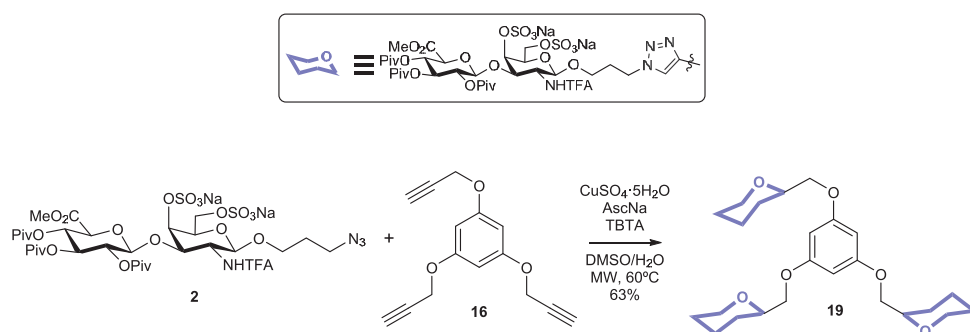


**Figura 3.14.** Estrategias sintéticas para la obtención de los glicodendrimeros.

Se comenzó abordando la primera de las estrategias para la formación de los glicodendrimeros, ya que de esta forma se facilitaba el seguimiento de la reacción y la purificación de los productos resultantes de la reacción "click" de acoplamiento. (**estrategia 1, Figura 3.14**) Además, al disponer el disacárido de todos sus grupos OH y el carboxilato protegidos, se evitaba el posible secuestro de los cationes Cu (I), facilitando la reacción.

Por lo tanto, se conjugó el disacárido sulfatado y totalmente protegido **2** y los diferentes núcleos dendríticos mediante una reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I), para obtener los correspondientes glicodendrimeros protegidos. En una segunda etapa, se llevaría a cabo una desprotección global seguida de *N*-acetilación, para llegar a los dendrímeros de sulfato de condroitina de tipo E finales, solubles en agua.

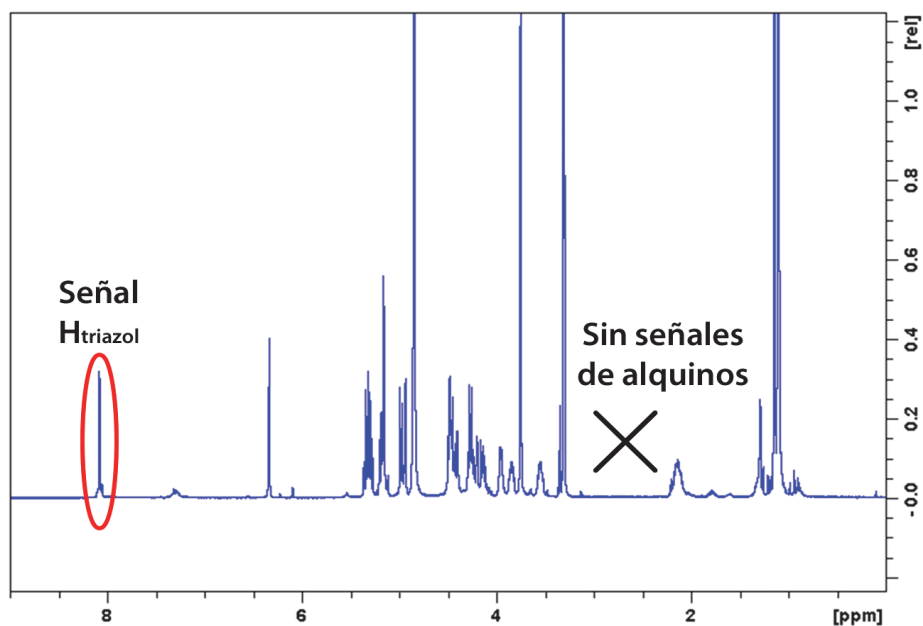
Para ello, se comenzó acoplando el disacárido **2** al núcleo tridentado **16**, utilizando CuSO<sub>4</sub> como fuente de cobre, ascorbato de sodio como reductor *in situ* de Cu(II) a Cu(I) y TBTA (Tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina) como estabilizador del Cu(I). El dendrímero trivalente protegido **19** fue obtenido con buen rendimiento después de calentar la reacción a 60°C durante 45 minutos usando radiación microondas. (**Figura 3.15**)



**Figura 3.15.** Esquema de síntesis del dendrímero **19**, a partir del disacárido **2** y el núcleo **16**.

La purificación de la reacción se llevó a cabo eliminando, en primer lugar, el cobre mediante el empleo de la resina Quadrasil MP (mercaptopropil), comercialmente disponible. Posteriormente, el compuesto se pasó a través de una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (Sephadex LH-20) en MeOH. El compuesto final fue caracterizado por RMN. La gran

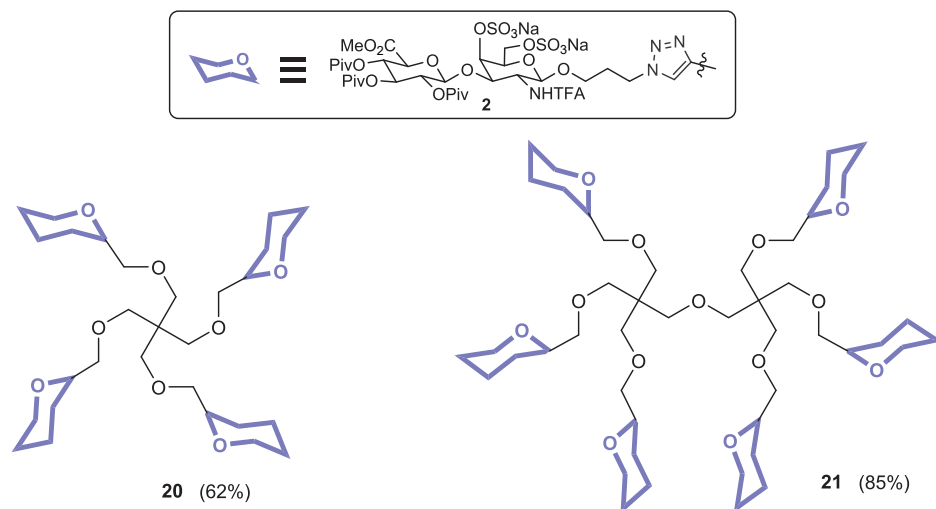
simetría de la molécula hace que el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN sea muy sencillo y fácil de interpretar, mostrando la aparición de una señal característica del protón del anillo de triazol a  $\delta = 8.08$  ppm, además de observarse la ausencia de señales correspondientes a los grupos alquino terminales del producto de partida. (**Figura 3.16**)



**Figura 3.16.** Espectro de  $^1\text{H}$ RMN del compuesto **19**, donde se observa la aparición de la señal del protón de los triazoles formados y la ausencia de señales de alquino del núcleo **16**.

De forma similar, el disacárido **2** se conjugó con los núcleos dendriméricos tetra- y hexavalentes **17** y **18** para dar lugar a los dendrímeros correspondientes **20** y **21**, respectivamente, con buenos rendimientos tras una primera purificación mediante Sephadex LH-20 en MeOH, seguida de una cromatografía en columna de gel de sílice. (**Figura 3.17**) Para obtener los compuestos como sales sódicas, los tres glicodendrímeros se trataron con una resina de intercambio iónico DOWEX  $\text{Na}^+$ .

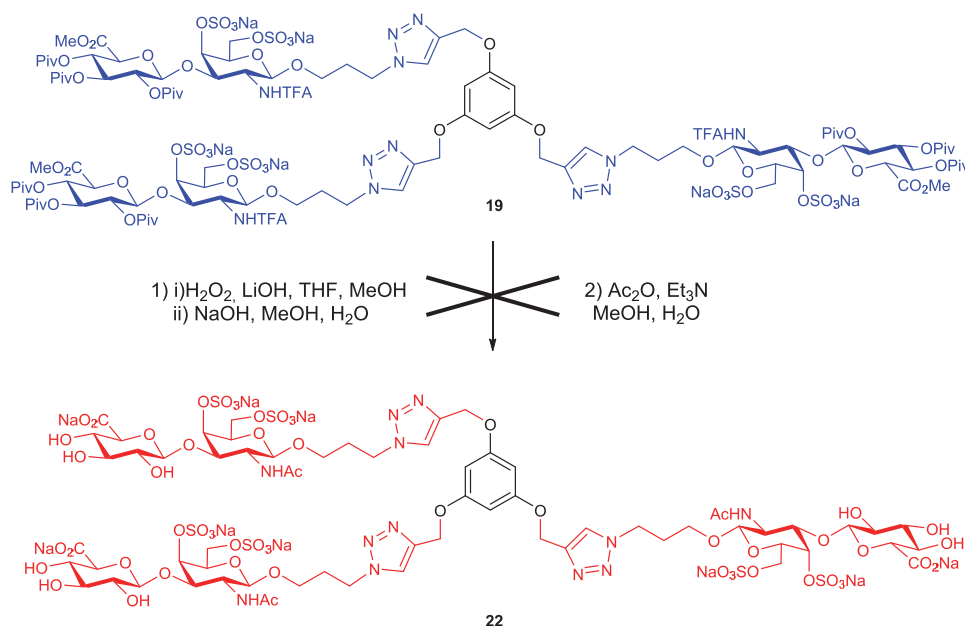
*Síntesis de dendrímeros de 1ª generación como glicomiméticos del CS-E y estudios de interacción con la Midkina*



**Figura 3.17.** Representación esquemática de los dendrímeros protegidos **20** y **21**, obtenidos a partir del disacárido **2** y los núcleos con 4 y 6 alquinos.

Una vez obtenidos los glicodendrímeros protegidos **19**, **20** y **21**, se abordó su desprotección mediante un tratamiento típico con  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{LiOH}$  y  $\text{NaOH}$ ,<sup>82</sup> seguido de *N*-acetilación selectiva del amino en la posición 2 de la galactosamina. (**Figura 3.18**) Sorprendentemente, esta desprotección dio lugar a una mezcla compleja de compuestos parcialmente desprotegidos, en la que no pudimos aislar el glicodendrímero mimético de CS puro. Además, la alta polaridad de los compuestos de la mezcla dificultaba el seguimiento de la reacción y la purificación, poniendo en evidencia que dicha estrategia no era la más apropiada para obtener los glicodendrímeros desprotegidos.

<sup>82</sup> de Paz, J. L.; Martín-Lomas, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 9, 1849-1858.



**Figura 3.18.** Esquema que muestra el intento de obtención del compuesto deseado **22** a partir de la desprotección del dendrímero protegido **19**.

Para poder resolver este problema, se exploró la segunda de las estrategias, la conjugación directa del disacárido desprotegido **1** y los núcleos dendríticos. (**estrategia 2, Figura 3.14**) En primer lugar, se llevó a cabo la cicloadición en condiciones similares a las usadas para la formación de **19**, **20** y **21**, pero no se observó reacción alguna. (**ensayo A, Tabla 3.2**) A continuación, se repitió la reacción aumentando las cantidades de  $\text{CuSO}_4$ , TBTA y ascorbato sódico, tanto a temperatura ambiente, como a  $60^\circ\text{C}$ , sin observar ninguna mejora. (**ensayos B-C, Tabla 3.2**) Tras dejar reaccionar durante una noche a temperatura ambiente, multiplicando por 10 las cantidades de  $\text{CuSO}_4$ , TBTA y ascorbato sódico del ensayo C, se observó una mejoría aunque, mediante experimentos de RMN, se determinó que la reacción no había terminado. (**ensayo D, Tabla 3.2**) Un resultado similar se obtuvo cuando la reacción se llevó a cabo a  $60^\circ\text{C}$ . (**ensayo E, Tabla 3.2**)

*Síntesis de dendrímeros de 1ª generación como glicomiméticos del CS-E y estudios de interacción con la Midkina*

Finalmente, se optimizó la reacción controlando el pH mediante el empleo de un tampón fosfato (pH = 7.4), disminuyendo la cantidad de DMSO como disolvente, y dejando reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente con el triple de las cantidades de CuSO<sub>4</sub>, TBTA y ascorbato que en el caso de la formación de **19**, **20** y **21**. (**ensayo G, Tabla 3.2**)

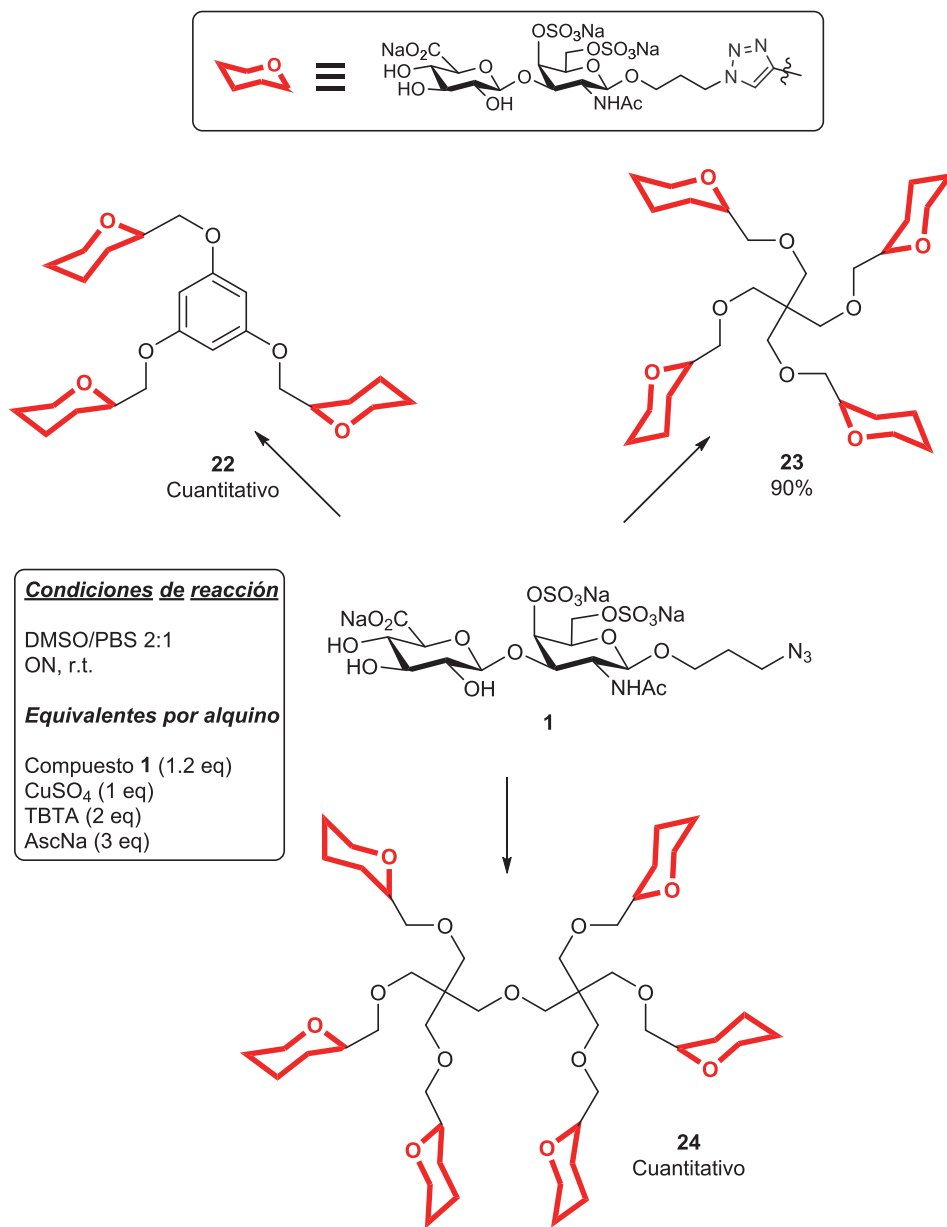
Ensayo	Equivalentes por grupo alquino				DMSO / PBS o H <sub>2</sub> O	Condiciones	Resultado
	Compuesto 1	CuSO <sub>4</sub>	TBTA	AscNa			
<b>A</b>	1.2	0.3	0.6	0.9	25:2 (H <sub>2</sub> O)	MW, 60°C, 50 min	No reacciona
<b>B</b>	1.2	0.6	1.2	1.8	25:2 (H <sub>2</sub> O)	ON, r.t.	No reacciona
<b>C</b>	1.2	0.9	1.8	2.7	25:2 (H <sub>2</sub> O)	MW, 60°C, 100 min	No reacciona
<b>D</b>	1.2	9	18	27	25:2 (H <sub>2</sub> O)	ON, r.t.	Reacción incompleta
<b>E</b>	1.2	9	18	27	25:2 (H <sub>2</sub> O)	MW, 60°C, 50 min	Reacción incompleta
<b>F</b>	1.2	1	2	3	5:1 (PBS)	MW, 60°C, 100 min	Reacción incompleta
<b>G</b>	1.2	1	2	3	2:1 (PBS)	ON, r.t.	Reacción Completa

**Tabla 3.2.** Tabla de optimización de condiciones para la formación del compuesto **22**.

En estas condiciones, la reacción de cicloadición entre los diferentes núcleos y el disacárido **1** pudo llevarse a cabo de forma completa, facilitando el proceso de purificación de los productos finales. Dicha purificación consistió en la eliminación del cobre mediante el empleo de la resina Quadrasil MP. Posteriormente, los compuestos se sometieron a una columna de Sephadex-LH20 en H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1. Finalmente, para obtener los glicodendrimeros **22**, **23** y **24** como sales sódicas, se trataron con una resina de intercambio iónico DOWEX Na<sup>+</sup>, obteniéndose en todos los casos unos rendimientos excelentes. (Figura 3.19)



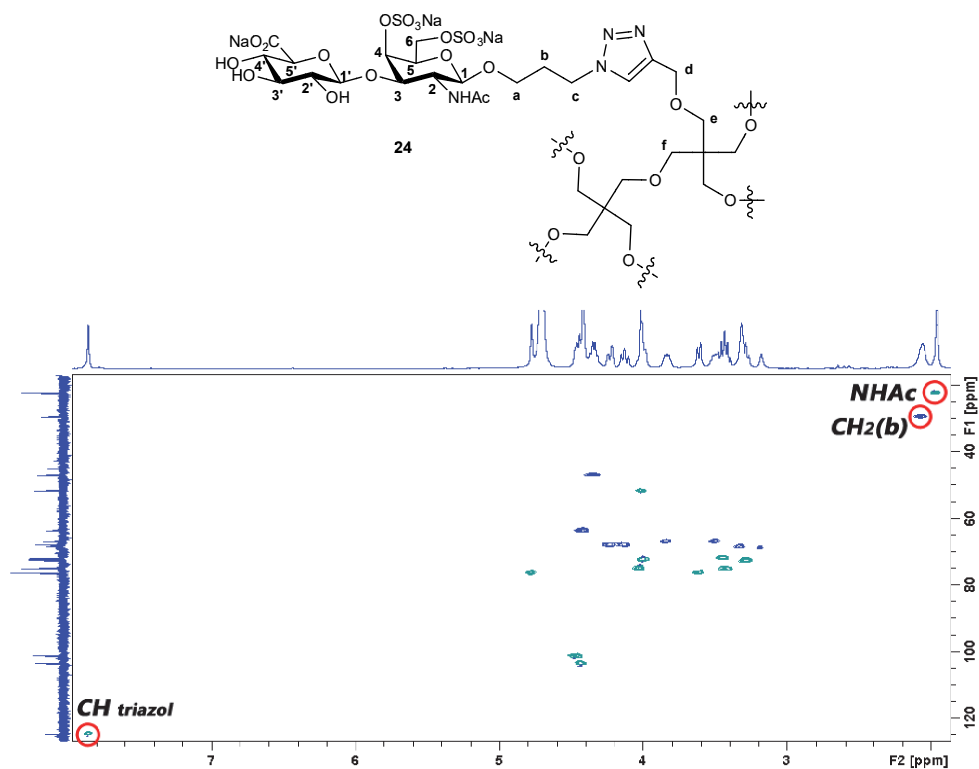
*Síntesis de dendrímeros de 1ª generación como glicomiméticos del CS-E y estudios de interacción con la Midkina*



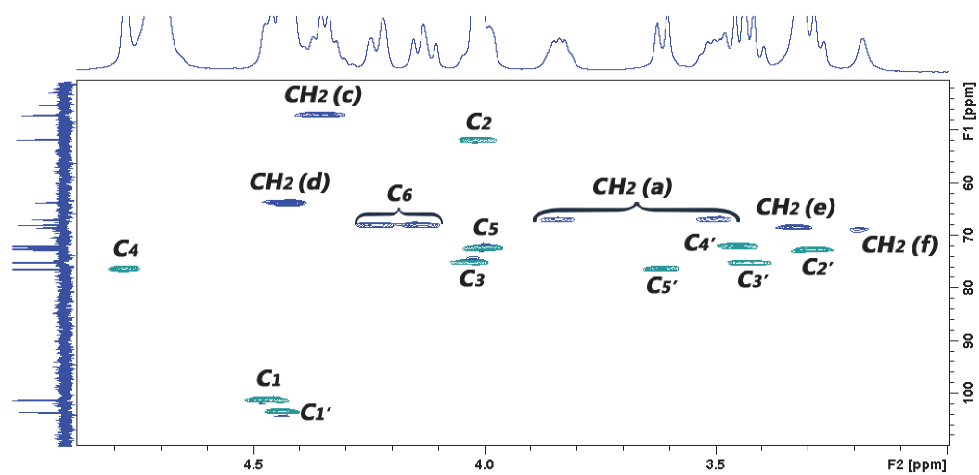
**Figura 3.19.** Esquema de la obtención de los dendrímeros **22**, **23** y **24** mediante conjugación directa del disacárido **1** y los núcleos de 3, 4 y 6 alquinos **16**, **17** y **18** respectivamente.

Los dendrímeros obtenidos fueron caracterizados mediante el empleo de técnicas de RMN y espectrometría de masas. Se utilizó la resonancia magnética nuclear de protón, de carbono y experimentos bidimensionales COSY (espectroscopía correlacionada de núcleos de la misma especie) y HSQC, observándose en los espectros señales muy definidas debido a la alta simetría de la molécula. Los espectros de HSQC fueron fundamentales para confirmar las estructuras de estos compuestos. Dichos espectros mostraban únicamente un juego de señales del azúcar, lo que indicaba la existencia de una única especie totalmente simétrica, ya que, en caso contrario, el espectro hubiera presentado una gran complejidad. A modo ilustrativo, en las **Figuras 3.20 y 3.21** se recoge el espectro de HSQC del glicodendrímero **24**, el más complejo de la familia de los glicodendrímeros de primera generación.

*Síntesis de dendrímeros de 1ª generación como glicomiméticos del CS-E y estudios de interacción con la Midkina*

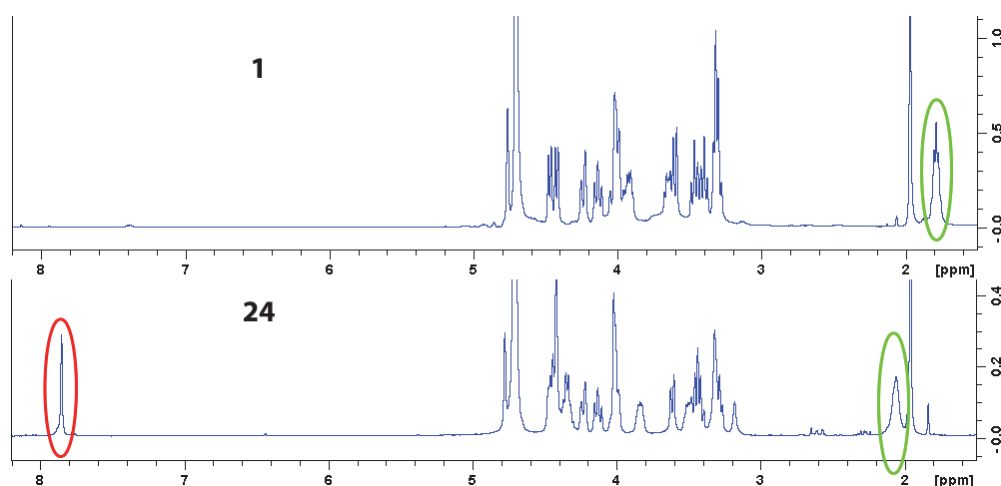


**Figura 3.20.** Espectro de HSQC del compuesto **24**, que muestra las señales a campo más alto y más bajo. Se puede observar la aparición de la señal alrededor de 8 ppm del CH del anillo de triazol.



**Figura 3.21.** Ampliación del espectro de HSQC donde se detalla la asignación de todos los protones y carbonos del compuesto **24**.

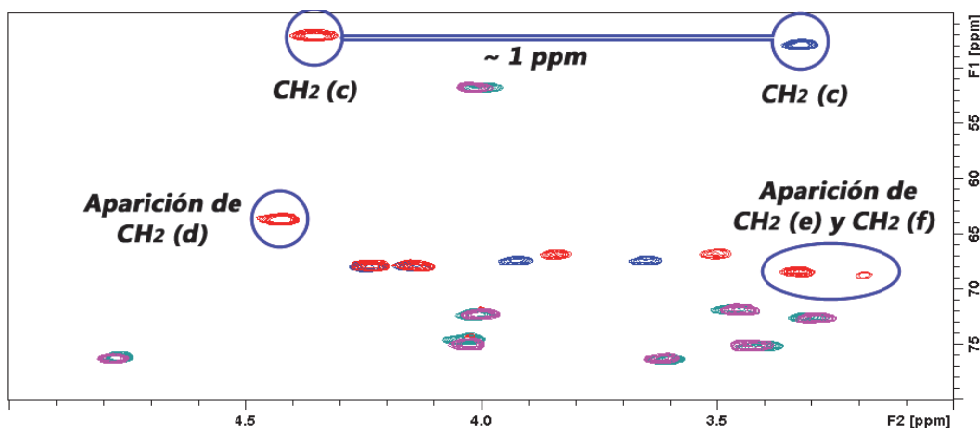
La confirmación de la estructura de estos compuestos también se apoya en la aparición y desaparición de ciertas señales tanto en  $^1\text{H}$ -RMN como en  $^{13}\text{C}$ -RMN, con respecto al producto de partida **1**, que pueden analizarse muy bien mediante experimentos HSQC. (**Figuras 3.20 y 3.21**) Tras llevar a cabo las reacciones de química “click” del ligando disacarídico y los núcleos dendriméricos, se pudieron observar cambios característicos en las señales de los productos. Dos de los cambios más significativos se pueden apreciar con facilidad en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, y consisten tanto en la aparición alrededor de 8 ppm de un singlete que corresponde al protón del anillo de triazol, como al desplazamiento hacia campo bajo de la señal correspondiente al  $\text{CH}_2$  interno del espaciador. ( **$\text{CH}_2$  (b), Figura 3.22**)



**Figura 3.22.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de los compuestos **1** (superior) y **24** (inferior), en el que se observa la variación de la señal del  $\text{CH}_2$  (b) en color verde y la aparición de la señal del  $\text{CH}_{\text{triazol}}$  en color rojo.

En los experimentos de HSQC se pueden observar otros cambios significativos de señales tales como la variación de desplazamiento químico que se observa para el  $\text{CH}_2$  unido al grupo  $\text{N}_3$ ,  $\text{CH}_2$  (c), que pasa de un

desplazamiento químico de 3.32 ppm en el caso del ligando **1** a 4.36 ppm en el dendrímero **24**, así como la aparición de los nuevos CH<sub>2</sub> del núcleo entre 3.1 y 4.5 ppm. (Figura 3.23)



**Figura 3.23.** Superposición de espectros de HSQC de los compuestos **1** (colores azul y verde) y **24** (colores rosa y rojo). Se observa el desplazamiento de alrededor de 1 ppm en protón de la señal de CH<sub>2</sub> (c) y la aparición de las señales del núcleo.

Una vez sintetizados y caracterizados los glicodendrímeros **22-24**, se procedió al estudio de su interacción con la proteína Midkina utilizando la técnica de polarización de fluorescencia.

### 3.2.4. Estudios de interacción proteína-ligando

Existen múltiples métodos para el estudio de las interacciones carbohidrato-proteína.<sup>83</sup> Entre las técnicas de análisis proteína-ligando más conocidas se encuentran: la resonancia magnética nuclear (RMN), la calorimetría

<sup>83</sup> Du, X.; Li, Y.; Xia, Y. L.; Ai, S. M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X. L.; Liu, S. Q. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 144-176.

isoterma de titulación (ITC), la resonancia del plasmón de superficie (SPR) y la polarización de fluorescencia (FP).

Las técnicas de RMN pueden aportar mucha información estructural relacionada con las interacciones proteína-ligando, permitiendo definir los epítopos o zonas de unión de las biomoléculas que intervienen en el fenómeno de reconocimiento.<sup>84</sup>

Las técnicas calorimétricas en cambio proporcionan, mediante titulación del ligando, información acerca de los parámetros termodinámicos cuantitativos que pueden ser utilizados para estimar la estabilidad de los complejos. El estudio por ITC es el único método para medir directamente el intercambio de calor a temperatura constante durante la formación de dichos complejos.<sup>85</sup>

Por otro lado, la técnica SPR consiste en un método basado en técnicas ópticas, que no precisa del marcaje de los compuestos y que, llevando a cabo medidas del índice de refracción, permite cuantificar en tiempo real la cinética y la afinidad de la unión proteína-ligando.<sup>85</sup>

Por último, la técnica que se ha empleado para llevar a cabo el análisis de la interacción entre la Midkina y nuestros glicomiméticos multivalentes de primera generación ha sido la polarización de fluorescencia (FP). Esta técnica requiere una mínima cantidad de ligando y de proteína y permite cuantificar dicha interacción mediante la realización de una serie de ensayos de competición con una etiqueta fluorescente.<sup>85</sup>

---

<sup>84</sup> Clarkson, J.; Campbell, I. D. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 1006-1009.

<sup>85</sup> Marchetti, R.; Perez, S.; Arda, A.; Imberty, A.; Jimenez-Barbero, J.; Silipo, A.; Molinaro, A. *ChemistryOpen* **2016**, *5*, 274-296.

### **3.2.4.1. Polarización de Fluorescencia (FP)**

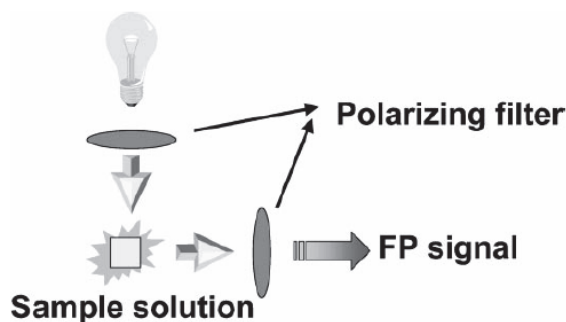
La polarización de fluorescencia es una técnica que permite el estudio de las interacciones moleculares en disolución entre dos moléculas como por ejemplo, proteína-ADN, ADN-ADN, proteína-proteína y carbohidrato-proteína, entre otros. Realmente, no se trata de una técnica nueva, ya que su base teórica aparece descrita por primera vez en la bibliografía en 1926,<sup>86</sup> aunque su uso no se ha intensificado hasta hace poco más de 20 años. Esta técnica se basa en la influencia del movimiento molecular de las sustancias fluorescentes sobre la polarización de la luz emitida, sin necesidad de inmovilizar ninguna de las moléculas que participan en la interacción, ni de ninguna separación física del exceso de ligando.

En la **Figura 3.24** podemos ver una ilustración esquemática sobre el funcionamiento de un equipo de medida de FP. Dicho equipo consta de una fuente de luz visible, cuyo haz se hace pasar por un filtro de una determinada longitud de onda de forma que la luz que irradia la muestra está polarizada. Tras ello, la muestra que contiene una sustancia fluorescente emite una intensidad de fluorescencia que es detectada tras atravesar otro filtro polarizado y recogida en el detector, obteniéndose así un valor de intensidad de la fluorescencia polarizada.<sup>87</sup>

---

<sup>86</sup> Perrin, F. J. *Phys. Radium*. **1926**, 7, 390 – 401.

<sup>87</sup> Kakei, K.; Oda, Y.; Kinoshita, M. *Anal. Biochem.* **2001**, 297, 111–116.



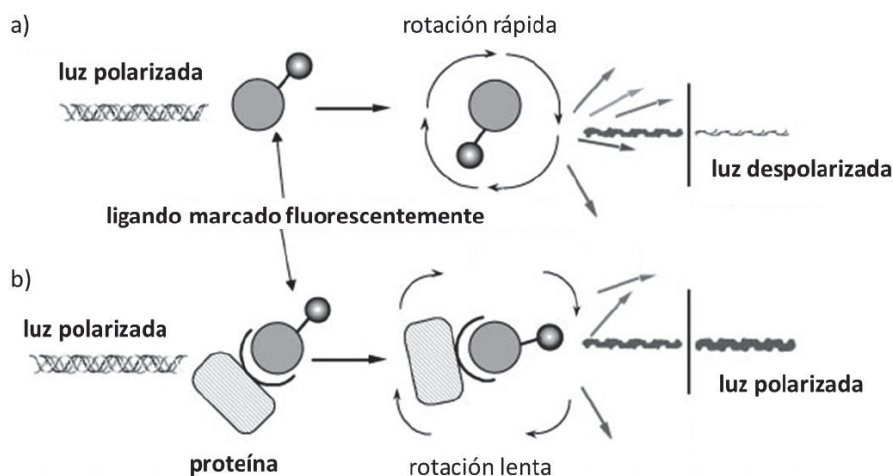
**Figura 3.24.** Representación esquemática del funcionamiento de un aparato de FP. Imagen extraída de: “*Anal. Biochem.* **2001**, 297, 111–116.”

Estos experimentos se pueden llevar a cabo utilizando placas de microtitulación que pueden ir desde 96 pocillos, pasando por 384 y hasta 1536, si se precisa de cribados de alto rendimiento. En cuanto a las etiquetas fluorescentes empleadas, se pueden utilizar diferentes familias de compuestos, teniendo en cuenta siempre que los máximos de absorción y emisión coincidan lo mejor posible con las longitudes de onda de los filtros polarizados aplicados a la fuente de luz y al detector.

La medida de FP depende de la velocidad con la que las moléculas fluorescentes giran en la disolución. Cuando estamos en el caso de moléculas pequeñas (**Figura 3.25, a**), el movimiento de estas sondas es muy rápido, de forma que cuando se excitan con una luz plana polarizada, la luz emitida se despolariza debido al rápido movimiento de la molécula. Por el contrario, cuando la sonda fluorescente forma parte de un complejo grande (**Figura 3.25, b**), como el que formarían la sonda y una proteína (receptor), la masa molecular es mucho mayor y el movimiento del complejo se restringe y se ralentiza. Una vez que la luz plana polarizada incide en dicho complejo, la luz emitida se encuentra más polarizada. La diferencia entre



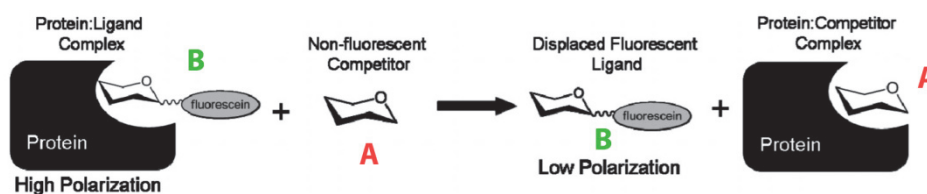
estos dos estados depende de la proporción de sonda que se encuentre unida a la proteína y de la constante de afinidad por ella.



**Figura 3.25.** Esquema del principio sobre el que está basada la polarización de fluorescencia. a) Moléculas pequeñas. b) Moléculas grandes, o complejos ligando-proteína.

Los experimentos que se llevaron a cabo para determinar la interacción entre los glicodendrímeros sintetizados y la Midkina fueron experimentos de competición en fase homogénea de FP. (**Figura 3.26**) Este tipo de ensayo consiste en que un ligando específico (**A**) que interacciona con una proteína es puesto en contacto con una muestra que contiene dicha proteína, previamente incubada con otra molécula que sirve de “etiqueta” o “marcador” fluorescente (**B**), capaz de generar una señal cuantificable. El ligando a estudiar compite por los sitios activos de la proteína con la molécula marcada y tras un período de tiempo corto, cuando el sistema se estabiliza, la relación entre las moléculas marcadas unidas a la proteína y libres es la que genera una señal de fluorescencia polarizada que es recogida por el detector, mediante la cual se puede determinar la interacción del ligando con la proteína. Este ensayo de competición permite cuantificar con

facilidad la afinidad relativa de un ligando sin necesidad de marcarlo fluorescentemente.



**Figura 3.26.** Esquema del funcionamiento de los ensayos de competición mediante FP.

Imagen extraída de: "*Org. Biomol. Chem.* **2013**, 21, 3510-3525."

Para que estos ensayos de competición puedan llevarse a cabo, en primer lugar, debe conocerse la constante de afinidad de la sonda fluorescente y la proteína. Esta puede obtenerse realizando una medida directa de su interacción. Para ello, se utiliza una concentración constante y conocida de la molécula fluorescente, a la cual se le van añadiendo concentraciones crecientes de proteína. Una vez obtenidos los resultados, se representa la polarización de la fluorescencia frente a la concentración de proteína, y de la gráfica, se obtiene la  $K_d$ , como se detalla más adelante.

Esta técnica es adecuada para el cribado de alto rendimiento, requiere muy poca cantidad de muestra y además, es muy conveniente para el análisis de la interacción de proteínas con ligandos pequeños o relativamente grandes. A pesar de estas ventajas, la polarización de fluorescencia ha tenido un uso muy limitado en este tipo de estudio de interacciones, ya que precisa de una instrumentación suficientemente sensible y apropiada, que no llegó hasta finales de la década de los 90.

### **3.2.4.2. Interacción mediante Polarización de Fluorescencia de los glicodendrimeros y la Midkina**

Una vez sintetizados los glicodendrimeros con tres, cuatro y seis copias del disacárido de CS-E, se evaluó la afinidad de estos sistemas por el receptor Midkina.<sup>70, 71a, 88</sup> Este factor de crecimiento, como se mencionó anteriormente, se encuentra implicado en múltiples procesos biológicos. Este hecho despierta un gran interés por encontrar nuevos ligandos que muestren buena afinidad como primer paso, para luego poder estudiar la posibilidad de modular sus diversas actividades biológicas.<sup>61</sup>

Para llevar a cabo las medidas de afinidad entre los glicodendrimeros sintetizados y la Midkina, se emplearon ensayos de competición mediante FP. Como se ha dicho anteriormente, es necesario disponer de una sonda fluorescente apropiada que interaccione fuertemente con este factor de crecimiento y poder así calcular la constante de disociación (Kd) de dicha sonda con la proteína. En los experimentos de competición suele utilizarse una concentración de proteína similar o ligeramente superior al valor de la Kd obtenida.<sup>89</sup>

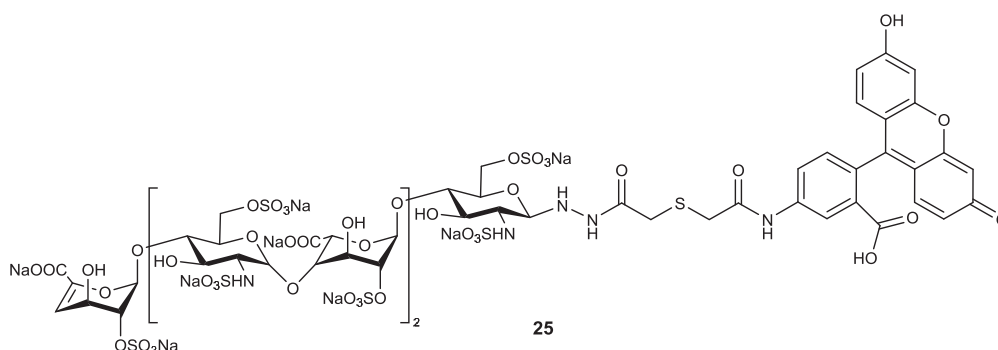
Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que un hexasacárido de heparina es un buen candidato para la obtención de una sonda fluorescente que dé lugar a una interacción fuerte con la Midkina. Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo la síntesis

---

<sup>88</sup> Gama, C. I.; Tully, S. E.; Sotogaku, N.; Clark, P. M.; Rawat, M.; Vaidehi, N.; Goddard, W. A.; Nishi, A.; Hsieh-Wilson, L. C. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 467-473.

<sup>89</sup> Sörme, P.; Kahl-Knutsson, B.; Huflejt, M.; Nilsson, U. J.; Leffler, H. *Anal. Biochem.* **2004**, 334, 36-47.

de dicha sonda a partir de un hexasacárido comercial derivado de la heparina natural, obtenido mediante despolimerización enzimática.<sup>73b</sup>

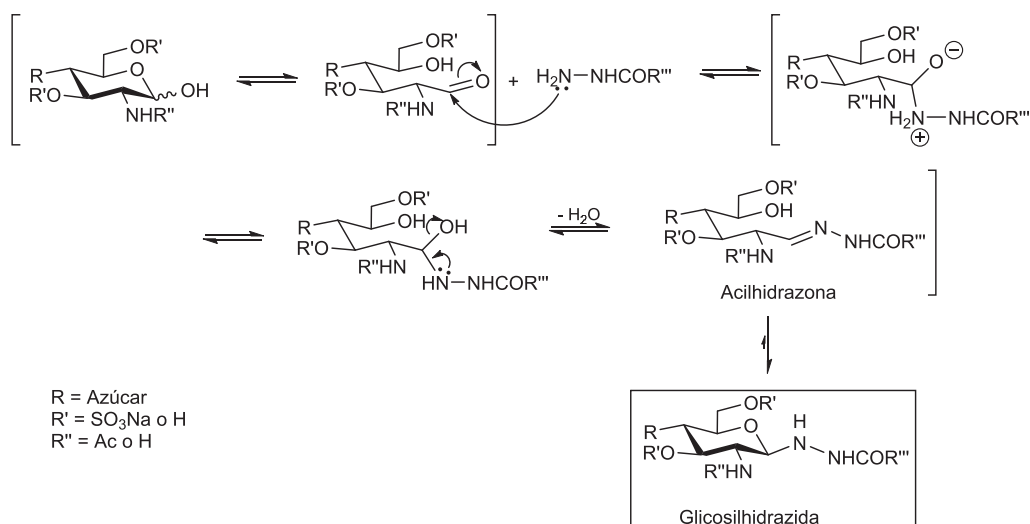


**Figura 3.27.** Estructura de la sonda fluorescente **25** constituida por un hexasacárido de heparina conjugado con fluoresceína.

Este hexasacárido se funcionalizó, haciendo uso del grupo aldehído del extremo reductor en su forma de cadena abierta, con un derivado hidrazida de la fluoresceína, para dar la correspondiente glicosilhidrazida con buen rendimiento. (**Figura 3.27**)

El acoplamiento del extremo reductor del azúcar con una hidrazida ( $\text{H}_2\text{NNHCOR}$ ), proporciona una acilhidrazona que se encuentra en equilibrio con la estructura de la glicosilhidrazida tautomérica de anillo cerrado. Este equilibrio está desplazado hacia este último, dando mayoritariamente el anómero  $\beta$  (típicamente relación  $\beta/\alpha$  9:1). (**Figura 3.28**)

*Síntesis de dendrímeros de 1ª generación como glicomiméticos  
del CS-E y estudios de interacción con la Midkina*



**Figura 3.28.** Esquema del mecanismo de formación de la glicosilhidrazida.

Este tipo de reacciones es muy interesante para la química de GAGs, ya que permite una funcionalización quimioselectiva, no requiere el uso de reactivos de acoplamiento y conserva la forma de piranosa nativa del azúcar del extremo reductor.<sup>90</sup>

Una vez obtenido el hexasacárido fluorescente de heparina, se llevaron a cabo los ensayos de unión directa entre esta sonda y la Midkina. Las medidas de FP se realizaron en microplacas de 384 pocillos (poliestireno negro, no tratado, Corning). Los datos de polarización se registraron utilizando un lector de multiplacas y empleando filtros de polarización con longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 535 nm, respectivamente.

Para llevar a cabo el experimento, tanto la sonda como la Midkina se disolvieron en PBS, pero a esta última se le añadió albúmina de suero bovino

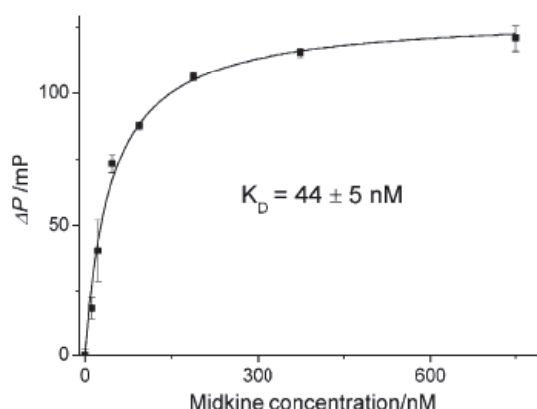
<sup>90</sup> Gemma, E.; Meyer, O.; Uhrin, D.; Hulme, A. N. *Mol. BioSyst.* **2008**, 4, 481-495.

(BSA). La adición de un exceso de BSA es necesaria tanto para evitar interacciones no específicas, como para mejorar la estabilidad de la proteína en disolución. Una concentración creciente de Midkina fue agregada a muestras que contenían una concentración fija de sonda fluorescente (20 nM), haciendo cada una de las medidas por triplicado. También se midió la FP de una muestra que contenía una disolución de sonda fluorescente en PBS con un 0.5% de BSA para obtener así la polarización residual en ausencia de proteína. Además se preparó como blanco una disolución de la Midkina en PBS con un 0.5% de BSA y su intensidad de fluorescencia residual se restó a los valores de fluorescencia de todos y cada uno de los pocillos.

Para calcular la variación en la polarización de fluorescencia ( $\Delta P$ ), se restó la polarización residual de la sonda fluorescente en ausencia de la Midkina a los valores de polarización de las muestras con proteína. Estas variaciones de polarización de fluorescencia se representaron frente a las concentraciones de la Midkina y la curva obtenida se ajustó a un modelo de interacción con un único centro activo (interacción 1:1):

$$y = \frac{\Delta P_{max} \cdot x}{K_D + x}$$

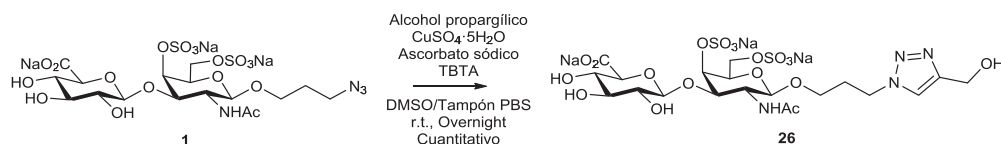
En la ecuación anterior,  $\Delta P_{max}$  es el valor máximo alcanzado con el empleo de concentraciones crecientes de Midkina y  $K_D$  la constante de disociación de la interacción entre la sonda fluorescente **25** y la Midkina. De esta forma, se pudo obtener un valor de  $K_D$  de  $44 \pm 5$  nM, tal y como se muestra en la **Figura 3.29**.



**Figura 3.29.** Representación gráfica del ensayo de interacción entre la Midkina y la sonda fluorescente **25**.  $\Delta P$  fue representado frente a la concentración de proteína y la gráfica fue ajustada a una ecuación modelo 1:1 para la interacción con un único centro activo.

Una vez obtenida la  $K_D$  de la interacción entre la sonda fluorescente (hexasacárido de heparina) y la Midkina, se comenzaron los experimentos de competición con los glicodendrímeros.

En primer lugar, se definió el ligando monovalente con el que se compararían los resultados de afinidad de los compuestos multivalentes. Para ello, se diseñó la síntesis de un nuevo disacárido de CS-E, **26**. (**Figura 3.30**) Este compuesto se consideró más apropiado que el disacárido **1**, ya que incorporaba el posible efecto proveniente del anillo de triazol en la interacción. Por lo tanto, su valor de afinidad relativa con la Midkina podría ser empleado como referencia de ligando monovalente en comparación con las estructuras dendríticas. El compuesto **26** se preparó fácilmente por cicloadición del disacárido **1** y el alcohol propargílico, reactivo disponible comercialmente.



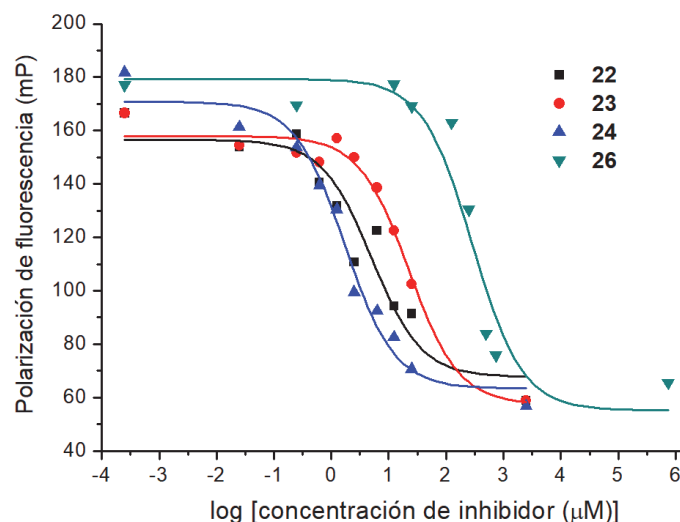
**Figura 3.30.** Formación del compuesto **26** a partir del disacárido **1**.

Una vez que todos los compuestos estuvieron sintetizados, se llevaron a cabo las medidas de FP. Para ello, se utilizó el mismo material y equipo que para la medida directa de la interacción sonda-proteína. Tanto la sonda fluorescente **25**, como los glicodendrimeros **22-24**, y los ligandos monovalentes **1** y **26** se disolvieron en tampón PBS. Para la Midkina, se preparó una disolución en tampón PBS al 1% de BSA. Se midieron los valores de polarización de fluorescencia de pocillos que contenían una concentración fija de proteína y de sonda fluorescente, en presencia de concentraciones crecientes de los distintos ligandos. Todas las medidas se realizaron al menos por triplicado y se obtuvieron los valores de los promedios de dichas medidas. Estos valores de polarización se representaron frente al logaritmo de la concentración del ligando, obteniéndose curvas de competición como las que se representan en la **Figura 3.31**, con la excepción del ligando monovalente **1**, del cual hablaremos más adelante.

Se incluyeron dos muestras control, la primera de ellas solo contenía sonda fluorescente **25** y proporcionaba el valor de polarización mínimo esperado para una inhibición del 100%. La segunda de las muestras control contenía la Midkina y la sonda fluorescente, en ausencia de ligando, y proporcionaba el valor de polarización de fluorescencia máximo, correspondiente al 0% de inhibición. También se preparó un blanco, que consistió en una disolución



de Midkina y del ligando a estudiar, en ausencia de la sonda, y cuyo valor de intensidad de fluorescencia se restó previamente a todos y cada uno de los pocillos.



**Figura 3.31.** Representación de las curvas de competición de los dendrímeros desprotegidos **22-24** y del ligando monovalente **26**.

Las curvas obtenidas se ajustaron a la siguiente ecuación, que corresponde a un modelo de competición con un único sitio de reconocimiento:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + 10^{x - \log(IC_{50})}}$$

Donde  $A_1$  y  $A_2$  son los valores máximo y mínimo de polarización esperados, respectivamente, e  $IC_{50}$  es la concentración de ligando que se precisa para que haya un 50% de inhibición de la interacción con la sonda. De esta forma, se obtuvieron valores de afinidad relativa expresados como  $IC_{50}$  para cada uno de los compuestos analizados. Al menos tres experimentos independientes se llevaron a cabo para cada cálculo de  $IC_{50}$ . (**Tabla 3.3**)

Compuesto	22	23	24	26
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	3.9 $\pm$ 1.4	15.0 $\pm$ 5.6	1.2 $\pm$ 0.6	305 $\pm$ 22
RIP	26	5	42	1

**Tabla 3.3.** Tabla de valores de IC<sub>50</sub> y RIP (potencia inhibitoria relativa) de los compuestos desprotegidos.

Como puede observarse en la tabla, los compuestos desprotegidos **22**, **23** y **24**, proporcionaron unos valores de IC<sub>50</sub> de 3.9, 15 y 1.2  $\mu$ M respectivamente, lo que indica una interacción fuerte entre la Midkina y los glicodendrimeros miméticos de CS-E, con valores de afinidad en el rango bajo micromolar. Estos resultados se compararon con los valores del ligando monovalente de referencia. El valor de IC<sub>50</sub> obtenido para el ligando **26** fue de 305  $\mu$ M, una afinidad de enlace que sí pudo obtenerse de forma precisa, a diferencia de lo que ocurría con el disacárido **1**. En ese caso, los bajos valores de inhibición observados, incluso a concentraciones de **1** muy altas, dificultaron el registro de una curva de competición adecuada para la cuantificación del IC<sub>50</sub>. En cualquier caso, los resultados obtenidos sugerían un valor de afinidad muy superior a 250  $\mu$ M, lo que está de acuerdo con los datos bibliográficos.<sup>40</sup>

Los valores RIP que aparecen en la **Tabla 3.3**, hacen referencia a la potencia inhibitoria relativa de los ligandos. Utilizando este parámetro, tenemos en cuenta tanto el valor de IC<sub>50</sub> de los compuestos, como la valencia o número de copias de disacárido presentes en cada uno de los dendrimeros, referenciando sus valores con respecto al ligando monovalente **26**. Su cálculo se lleva a cabo mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$\text{Potencia inhibitoria relativa (RIP)} = \frac{(IC_{50})_{\text{monovalente 26}}}{(IC_{50} \cdot \text{Valencia})}$$

Así pues, en la tabla puede apreciarse que los glicodendrímeros trivalente **22**, tetravalente **23** y hexavalente **24** mostraron unas potencias inhibitorias relativas (RIP) por unidad de azúcar de 26, 5 y 42 respectivamente (**Tabla 3.3**), indicando que tanto la valencia, como la naturaleza del núcleo dendrítico influyen en la actividad de estos compuestos y confirmando el aumento de la afinidad por la presentación multivalente.

Es llamativo que los resultados de interacción ligando-proteína varíen en la forma que lo hacen. El compuesto de 3 copias (**22**) muestra un  $IC_{50}$  menor que en el caso del compuesto de 4 (**23**), mientras que el dendrímero con 6 copias (**24**) tiene el  $IC_{50}$  más bajo de la serie. La mayor interacción del dendrímero trivalente frente al tetravalente puede deberse a la presencia del anillo aromático central en el compuesto **22**, y a la disposición espacial impuesta por el núcleo dendrítico, que favorece el reconocimiento molecular de este derivado con la Midkina. En general, se puede concluir que los dendrímeros desprotegidos miméticos del CS-E incrementan fuertemente su interacción con la Midkina debido al efecto multivalente, confirmando su utilidad como miméticos del polisacárido natural, con potencial para modular las funciones biológicas de la Midkina.<sup>91</sup>

Por último, en el transcurso de la presente Tesis Doctoral, en nuestro grupo de investigación se puso de manifiesto que la Midkina mostraba afinidades

---

<sup>91</sup> Dominguez-Rodriguez, P.; Reina, J. J.; Gil-Caballero, S.; Nieto, P. M.; de Paz, J. L.; Rojo, J. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 11338-11345.

mayores por ligandos oligosacáridicos con los grupos OH funcionalizados con grupos protectores hidrofóbicos. Este hecho nos llevó a analizar también, mediante ensayos de competición de FP, los glicodendrimeros protegidos **19-21** y compararlos con el ligando monovalente **2**, cuyo valor de  $IC_{50}$  con la Midkina (15  $\mu M$ ) ya había sido descrito por nuestro grupo de investigación anteriormente.<sup>70b</sup> (**Tabla 3.4**)

Compuesto	19	20	21	2
$IC_{50}(\mu M)$	$2.4 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.5$	$4.5 \pm 0.1$	15
RIP	2	0.8	0.6	1

**Tabla 3.4.** Valores de  $IC_{50}$  y RIP de los compuestos protegidos.

Como puede verse en la **Tabla 3.4**, los compuestos **19**, **20** y **21** mostraron unos  $IC_{50}$  de 2.4, 4.5 y 4.5  $\mu M$ , respectivamente. Así pues, todos los glicodendrimeros protegidos mostraban también una interacción fuerte con la proteína Midkina. Sin embargo, debemos destacar el hecho de que aun siendo el ligando monovalente protegido **2**, mucho más afín a la Midkina que los ligandos monovalentes desprotegidos **1** y **26** ( $IC_{50} > 250 \mu M$  y  $305 \mu M$  respectivamente), las afinidades de **19-21** son similares a las obtenidas con los correspondientes compuestos desprotegidos **22-24**. De hecho, los valores de la potencia inhibitoria relativa (RIP) que muestran los dendrimeros protegidos indican una ausencia de efecto multivalente, obteniéndose en dos de los casos valores inferiores a 1. Del estudio llevado a cabo con los compuestos protegidos podemos extraer, por lo tanto, dos conclusiones. La primera de ellas es que la interacción de dichos compuestos y la Midkina es fuerte, ya que alcanza el rango bajo micromolar.

La segunda es la ausencia de efecto multivalente en estos compuestos, dato que puede comprobarse mediante los valores de RIP de los glicodendrímeros y los valores de  $IC_{50}$  que no disminuyen al aumentar el número de copias en el compuesto. Esto podría deberse al impedimento estérico que los grupos protectores le proporcionan a la molécula, evitando una buena interacción con el centro de reconocimiento de la proteína.



## **CAPÍTULO 4.**

# **SÍNTESIS DE DENDRONES Y DENDRÍMEROS DE CS-E DE 2<sup>a</sup> GENERACIÓN.**

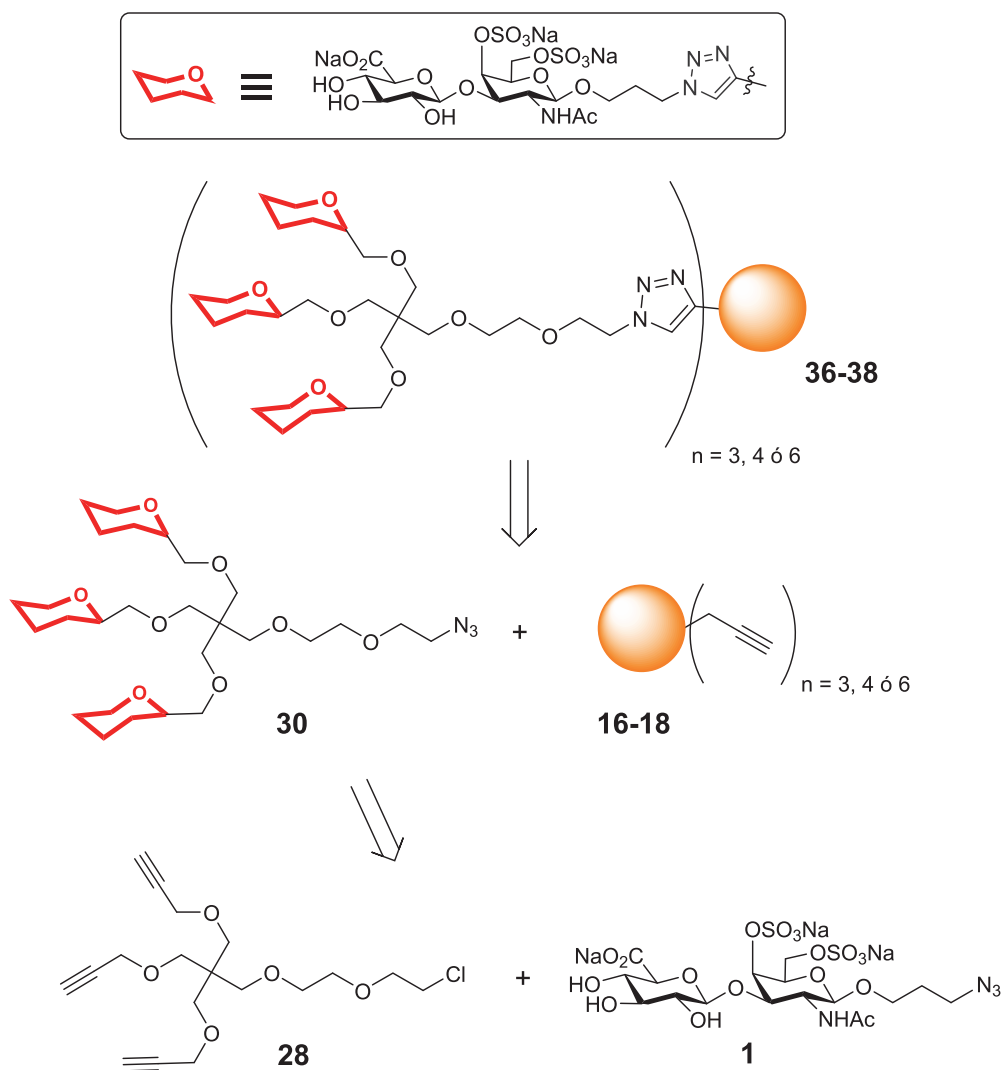




## **4.1. Resultados y discusión**

Una vez obtenidos los dendrímeros de primera generación tal y como se describe en el capítulo anterior, se abordó la preparación de sistemas multivalentes más complejos, con una valencia mayor y que por lo tanto presentaban un mayor número de copias del ligando disacárido en su estructura. (**Figura 4.1**)

En el presente capítulo se muestra, en primer lugar, la preparación de los dendrones protegidos ortogonalmente en su posición focal, para su posterior empleo en la formación de estructuras dendriméricas de segunda generación, mediante una ruta de síntesis convergente. Además, dicho dendrón ortogonal también ha sido empleado para la obtención de un compuesto fluorescente mediante su conjugación, a través de su posición focal, con un derivado de fluoresceína.



**Figura 4.1.** Esquema retrosintético para la preparación de los dendrímeros de 2ª generación **36-38**.

#### 4.1.1. Síntesis del dendrón funcionalizado ortogonalmente en su posición focal

Para poder llevar a cabo la síntesis del dendrón objetivo, en primer lugar, se preparó un núcleo dendrimérico adecuadamente funcionalizado y protegido selectivamente en la posición focal. Para ello, se partió del pentaeritritol, el cual se hizo reaccionar con NaH y 3 equivalentes de bromuro de propargilo, obteniendo así el compuesto **27** que presenta 3 grupos alquino en su estructura.<sup>81,92</sup> (Figura 4.2) A continuación, siguiendo el procedimiento experimental descrito en la bibliografía,<sup>92</sup> el derivado **27** se hizo reaccionar con el 2-cloroetiléter en presencia de NaOH al 50% e hidrogenosulfato de tetrabutilamonio durante 1 día a 45°C. De esta forma, se obtuvo el compuesto **28** con un rendimiento del 72% tras purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice.

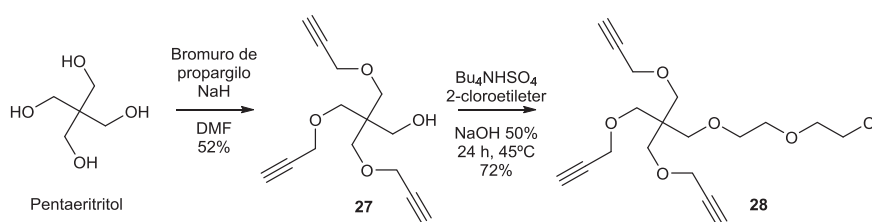
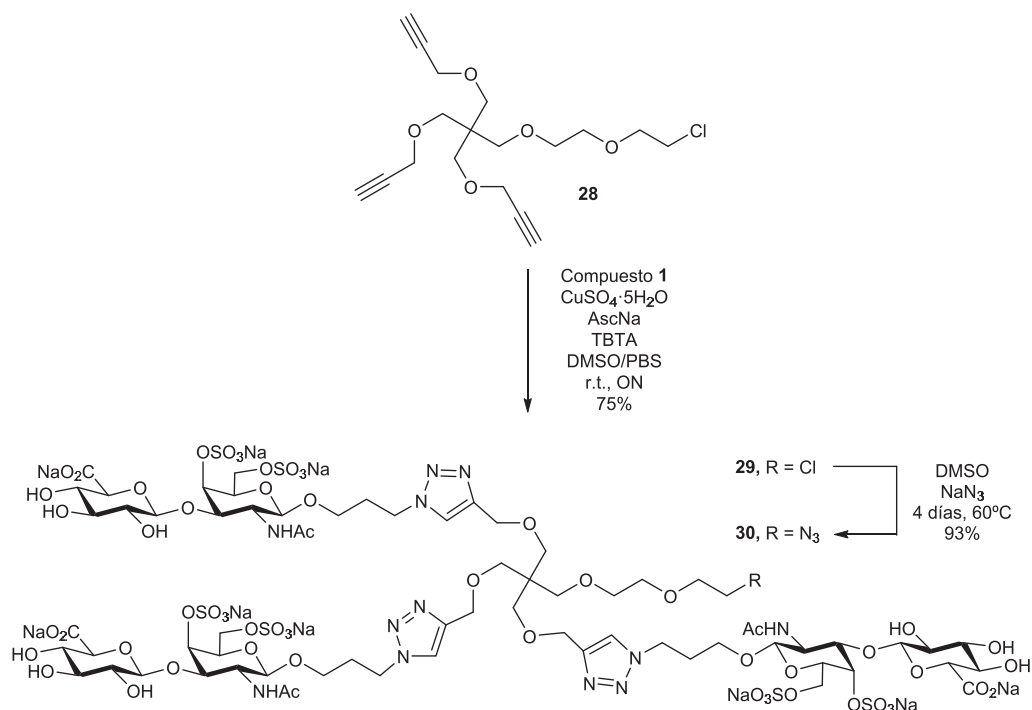


Figura 4.2. Síntesis del núcleo dendrítico **28**.

Una vez sintetizado el núcleo trivalente **28**, que presenta en la posición focal una cadena de dietilenglicol con un átomo de cloro terminal, éste se conjugó con el disacárido de CS-E **1** mediante una reacción de cicloadición entre azida y alquino catalizada por Cu (I) (CuAAC). (Figura 4.3) De esta

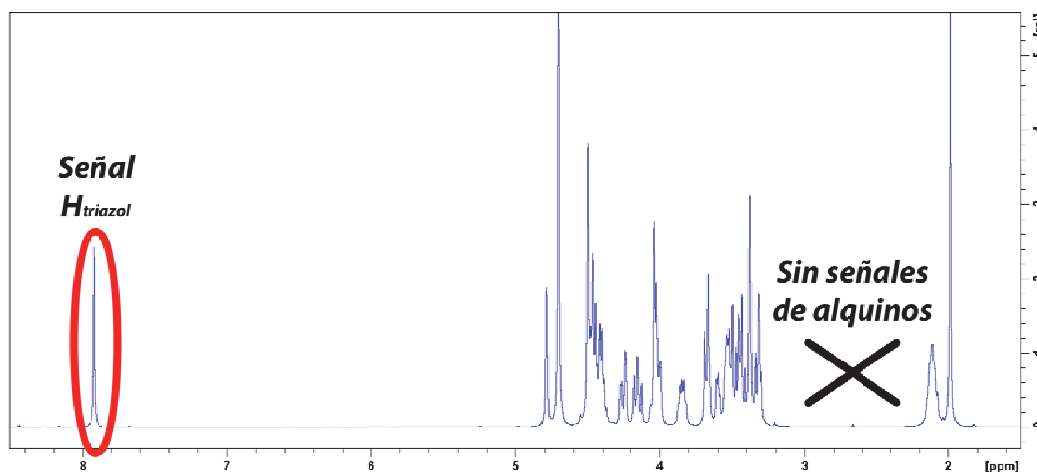
<sup>92</sup> Ortega-Muñoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2410-2420.

forma se obtuvo el dendrón trivalente que serviría de motivo de repetición en la síntesis de los dendrímeros de segunda generación.



**Figura 4.3.** Síntesis del dendrón **30** funcionalizado en la posición focal con un grupo  $\text{N}_3$ .

Para llevar a cabo dicha cicloadición se emplearon las condiciones de reacción optimizadas en el capítulo anterior, obteniéndose así el dendrón **29** con buen rendimiento. En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, se observó la aparición de la señal característica del protón del triazol y la desaparición de los protones de los grupos alquino del núcleo. (**Figura 4.4**)

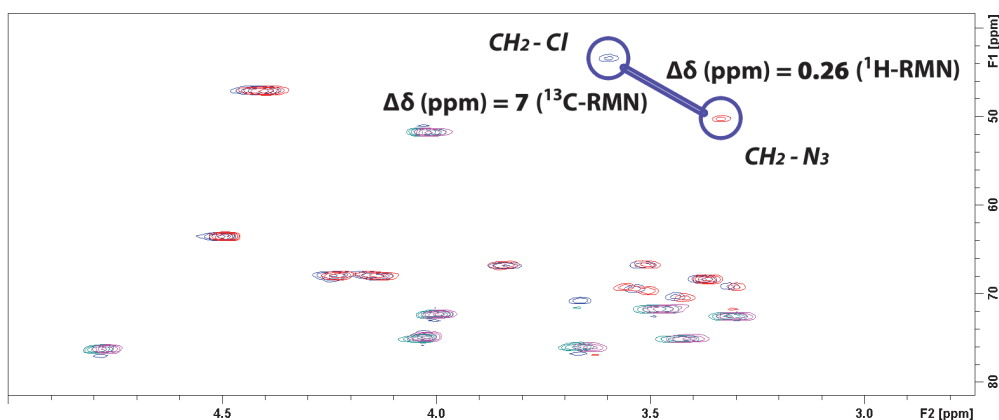


**Figura 4.4.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **29**, donde se observa (en rojo) la aparición de la señal del protón del triazol formado y la ausencia de la señal del protón del alquino del núcleo **28**.

La siguiente etapa de reacción consistió en la activación de la posición focal. Para ello, se llevó a cabo la sustitución del átomo de Cl por un grupo azido, que en una etapa posterior, permitiría su uso tanto para la formación de dendrímeros de segunda generación como para la obtención de nuevos dendrones funcionalizados con un marcador fluorescente en su posición focal. Dicho intercambio Cl/ $\text{N}_3$  se llevó a cabo haciendo reaccionar el compuesto **29** durante 4 días a  $60^\circ\text{C}$  con  $\text{NaN}_3$ , para obtener el dendrón **30**.<sup>93</sup> (Figura 4.3) La gran similitud, en cuanto a polaridad, de los compuestos **29** y **30**, dificultó en gran medida el seguimiento de la reacción por TLC. Para poder confirmar que el producto de partida había reaccionado completamente, dando como resultado el compuesto **30**, se realizó un experimento bidimensional HSQC (Figura 4.5), haciendo un especial

<sup>93</sup> Ribeiro-Viana, R.; Sanchez-Navarro, M.; Luczkowiak, J.; Koeppe, J. R.; Delgado, R.; Rojo, J.; Davis, B. G. *Nat. Commun.* **2012**, 3, 1303-1310.

hincapié en el seguimiento de la señal del CH<sub>2</sub> inmediatamente contiguo al grupo N<sub>3</sub>.

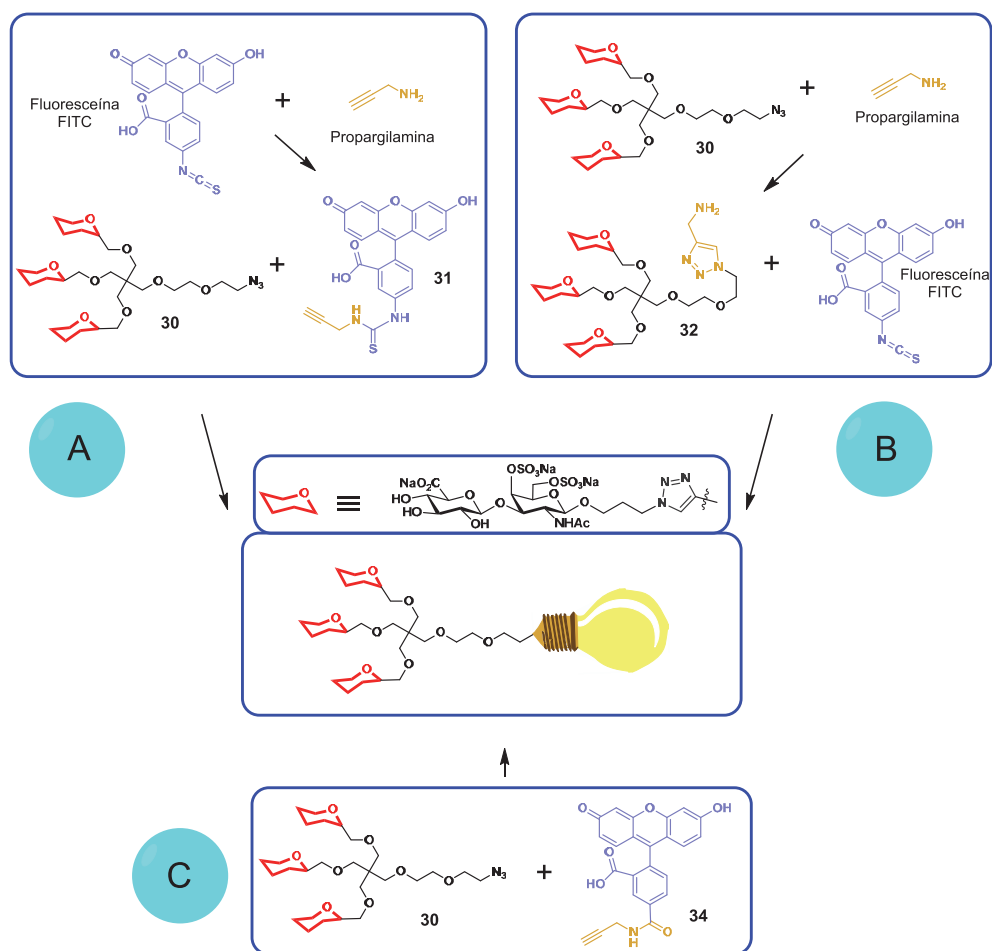


**Figura 4.5.** Superposición de los espectros de HSQC de los compuestos **29** (colores azul y verde) y **30** (colores rosa y rojo).

Tal y como puede observarse en la imagen, la mayoría de las señales que aparecen en el HSQC correspondientes a los compuestos **29** y **30** se solapan, ya que la variación estructural de las moléculas es mínima, pero sí puede observarse la desaparición de la señal correspondiente al CH<sub>2</sub>-Cl (con un desplazamiento químico de 3.60 ppm en el espectro de protón y 43.4 ppm en el espectro de carbono), y la aparición de la señal correspondiente al CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub> (con un desplazamiento químico de 3.33 ppm en el espectro de protón y 50.2 ppm en el espectro de carbono). Una vez obtenido el compuesto **30**, funcionalizado con un grupo azida en su posición focal, este compuesto se utilizó tanto para obtener dendrones marcados fluorescentemente como dendrímeros de segunda generación.

#### **4.1.2. Síntesis de un dendrón marcado fluorescentemente**

El marcaje fluorescente de los sistemas multivalentes de CS-E permite su empleo como sondas en diferentes estudios biológicos. Para la obtención de estos compuestos fluorescentes, se usó como producto de partida el dendrón trivalente **30**, que contiene un grupo azida en su posición focal, que se conjugó con un derivado de fluoresceína adecuadamente funcionalizado, a través de dicha posición focal. Para la formación de este compuesto fluorescente con disacáridos de CS-E, se exploraron 3 estrategias sintéticas diferentes que se describirán en detalle a continuación. (**Figura 4.6**)



**Figura 4.6.** Metodologías sintéticas para la obtención de un dendrón fluorescente derivado de CS-E funcionalizado con fluoresceína en su posición focal. A) En primer lugar se funcionaliza la molécula de fluoresceína con propargilamina para finalmente hacerla reaccionar con el dendrón **30**; B) Primero se funcionaliza el dendrón **30** con propargilamina, y posteriormente se lleva a cabo la conjugación con fluoresceína; C) Conjunción directa de fluoresceína funcionalizada con un grupo alquino con el compuesto **30**.

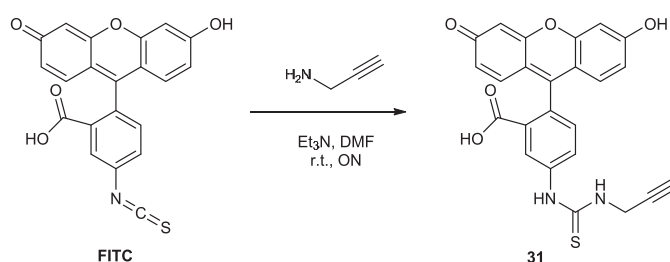
Tanto la aproximación **A**, como la **B**, precisan de dos etapas de reacción para la obtención del producto deseado y utilizan la fluoresceína isotiocianato (FITC), un reactivo fluorescente muy común y barato. En cambio, en la



metodología **C**, se emplea un derivado de fluoresceína funcionalizado con un grupo alquino, también disponible comercialmente, que permite su conjugación directa con el dendrón **30** para obtener la molécula objetivo en un solo paso de reacción.

#### 4.1.2.1. Metodología sintética A para preparar el dendrón fluorescente **33**

En el caso de la primera ruta sintética (**Aproximación A, Figura 4.6**), se empleó como material de partida fluoresceína isotiocianato (FITC), disponible comercialmente. Ésta se hizo reaccionar con propargilamina en DMF anhidra, siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía.<sup>94</sup> (**Figura 4.7**)



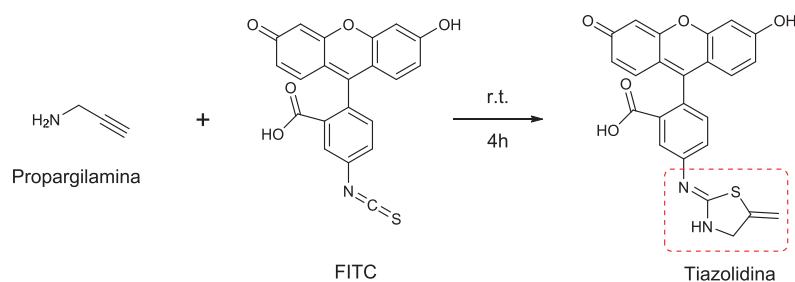
**Figura 4.7.** Síntesis descrita para la obtención de **31**.<sup>94</sup>

En dicho protocolo se describe la síntesis de este compuesto con un alto rendimiento tras purificación mediante cromatografía en columna. Sin embargo, cuando la reacción se llevó a cabo en nuestro laboratorio, se obtuvo una mezcla compleja de compuestos de la que pudo aislarse,

<sup>94</sup> a) Nuhn, L.; Kaps, L.; Diken, M.; Schuppan, D.; Zentel, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2016**, 37, 924-933; b) Ikeda, M.; Minari, J.; Shimada, N.; Numata, M.; Sakurai, K.; Shinkai, S. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2219-2224.

mediante cromatografía en columna y con un bajo rendimiento, un producto cuyos datos espectroscópicos coincidían con los del derivado **31** recogidos en la bibliografía. No obstante, las señales del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN no permitían la asignación inequívoca de su estructura. Tras llevar a cabo una nueva búsqueda bibliográfica, se encontró un artículo que explicaba los resultados obtenidos en esta reacción.<sup>95</sup>

En dicho artículo, Clausen y colaboradores señalan que la formación de tiazolidinas puede producirse al hacer reaccionar propargilamina con fluoresceína isotiocianato.<sup>95</sup> (**Figura 4.8**) Así, el derivado de tiazolidina se aísla como producto mayoritario cuando la reacción se lleva a cabo en una mezcla de agua/*tert*-butanol en condiciones suaves. En nuestro caso, los datos de RMN del producto obtenido en la reacción entre la propargilamina y la FITC pudieron asignarse a la estructura del derivado de tiazolidina, no a la del compuesto deseado **31**, por lo que se abandonó esta estrategia para la síntesis del dendrón fluorescente objetivo.

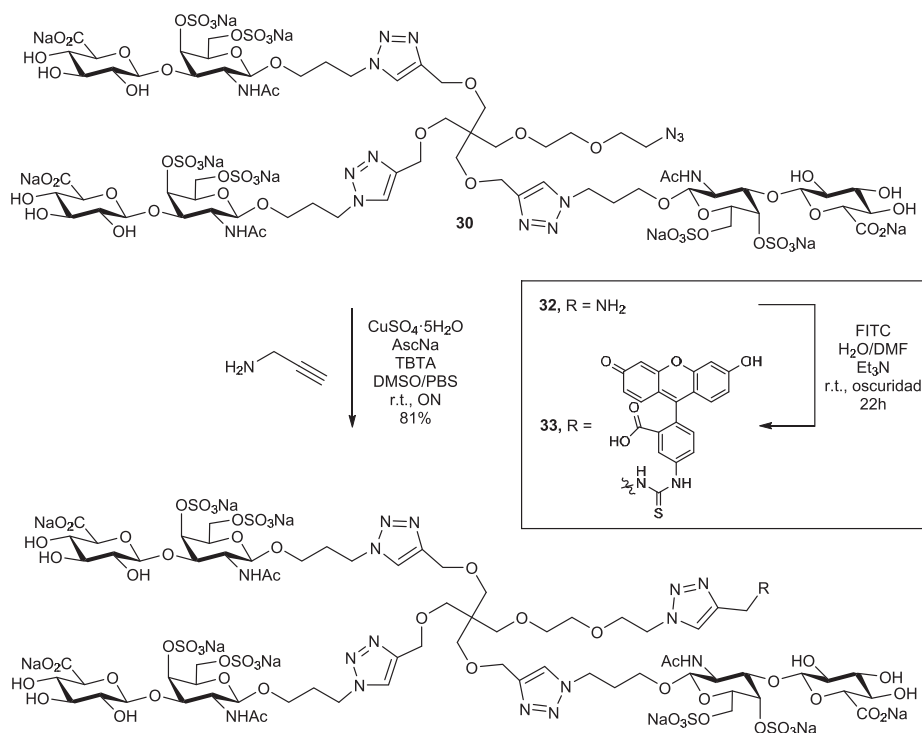


**Figura 4.8.** Reacción de formación del anillo de tiazolidina entre la propargilamina y la FITC.<sup>95</sup>

<sup>95</sup> Viart, H. M. F.; Larsen, T. S.; Tassone, C.; Andresen, T. L.; Clausen, M. H. *Chem. Commun.* **2015**, 50, 7800-7802.

#### 4.1.2.2. Metodología sintética B para preparar el dendrón fluorescente 33

Para evitar la formación del anillo de tiazolidina y preparar el dendrón fluorescente objetivo, se llevó a cabo la exploración de la segunda estrategia descrita (**Aproximación B, Figura 4.6**). Dicha estrategia consistió, en primer lugar, en la reacción CuAAC del dendrón **30** con la propargilamina, empleando las condiciones ya optimizadas. (**Figura 4.9**) De esta forma, al hacer uso del grupo alquino de la propargilamina para acoplar mediante química “click” el dendrón, se evitaba la formación de anillos de tiazolidina en la siguiente reacción de conjugación con la FITC.



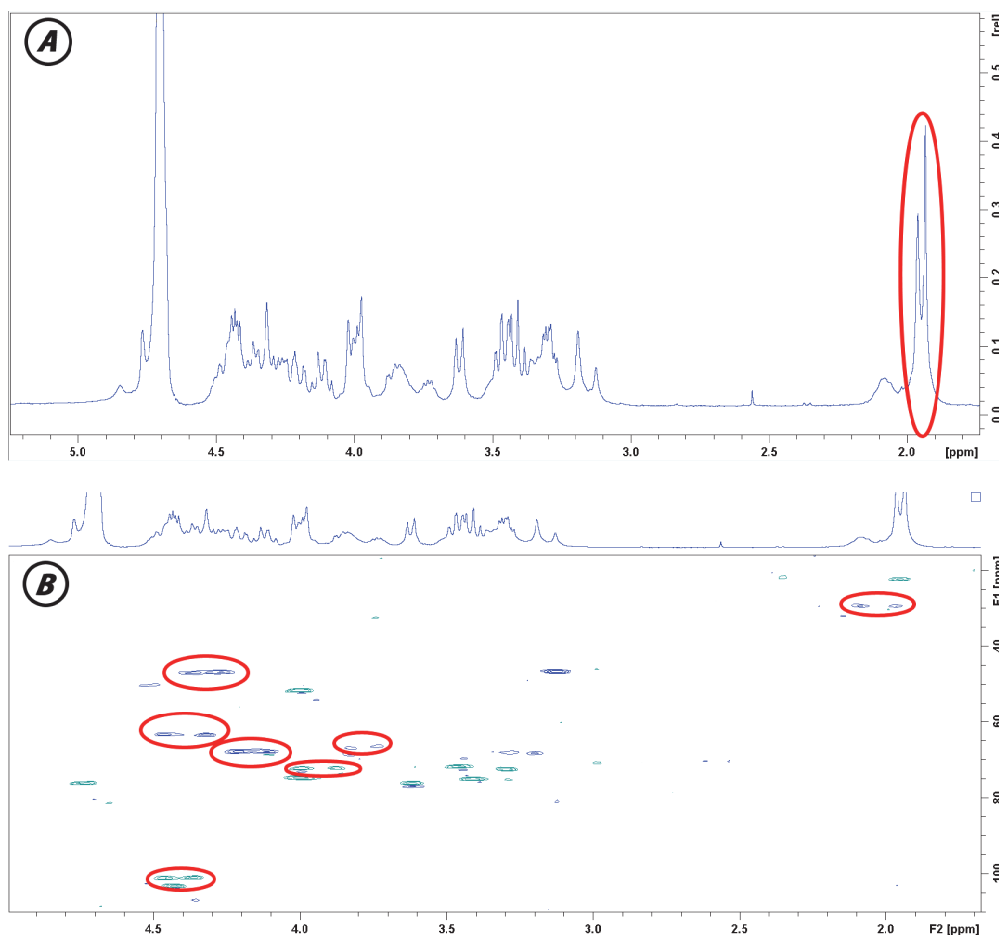
**Figura 4.9.** Segunda estrategia de síntesis del dendrón fluorescente **33**.

La primera etapa de esta síntesis dio lugar al dendrón **32** con un rendimiento del 81%. A continuación, se procedió con la segunda etapa del proceso, que consistió en la reacción entre el dendrón funcionalizado con un grupo amino y la FITC. (**Figura 4.9**) Esta conjugación se llevó a cabo en completa oscuridad, disolviendo el FITC y el compuesto **32** en una disolución H<sub>2</sub>O/DMF 2:1 con Et<sub>3</sub>N, agitándose a temperatura ambiente durante toda la noche.<sup>96</sup>

La mezcla de reacción resultante se purificó mediante cromatografía de exclusión de tamaño empleando Sephadex LH-20 en H<sub>2</sub>O/MeOH (9:1) y posteriormente, mediante una resina de intercambio iónico DOWEX Na<sup>+</sup>, para obtener el compuesto **33** como una sal sódica, que se caracterizó mediante RMN. (**Figura 4.10**)

---

<sup>96</sup> a) Peng, W.; Paulson, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12450-12458; b) Coxon, T. P.; Fallows, T. W.; Gough, J. E.; Webb, S. J. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10751-10761.



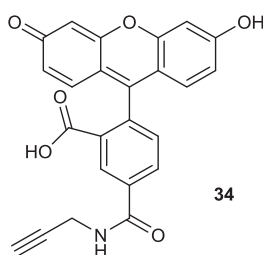
**Figura 4.10.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN A) y HSQC B) del compuesto **33**.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 4.10, A**), se detectaron señales duplicadas, que indicaron que el producto obtenido era una mezcla de 2 compuestos que no podían separarse por técnicas cromatográficas. Así, se observaron 2 singletes a campo alto, correspondientes a los  $\text{CH}_3$  de los grupos acetamido de los azúcares. Esta duplicidad de señales se pudo observar más claramente en el experimento de HSQC. (**Figura 4.10, B**) Este hecho confirmaba la existencia de una mezcla de compuestos tras la purificación de la reacción, similares en tamaño y que no fueron identificados. Por lo

tanto, en este punto se decidió abordar la tercera estrategia sintética para la obtención del dendrón fluorescente objetivo.

#### 4.1.2.3. Metodología sintética C para preparar el dendrón fluorescente 35

Debido a que las 2 primeras estrategias no nos permitieron obtener el dendrón fluorescente **33** deseado, se decidió explorar la tercera estrategia sintética propuesta (**Aproximación C, Figura 4.6**). Para ello, se usó el compuesto fluorescente derivado de fluoresceína **34**, (**Figura 4.11**) disponible comercialmente, que estaba ya funcionalizado con un grupo alquino, que permitiría la conjugación directa con el dendrón **30**, mediante la reacción CuAAC.

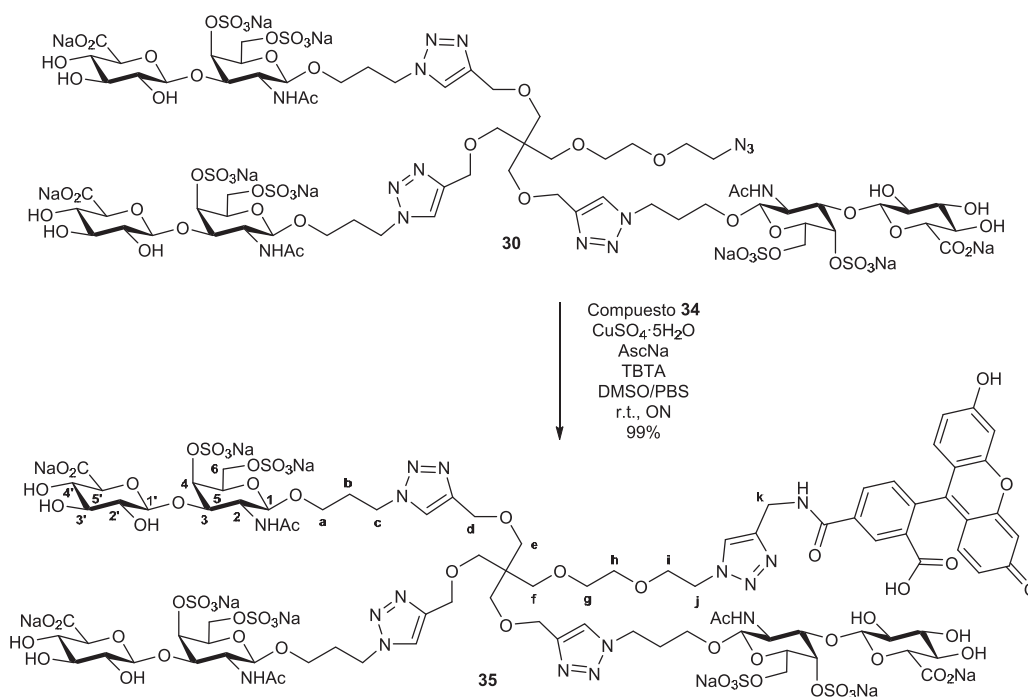


**Figura 4.11.** Estructura de la fluoresceína comercial funcionalizada con un grupo alquino, **34**.

La reacción de cicloadición se llevó a cabo empleando las condiciones optimizadas en la presente Tesis Doctoral para este tipo de reacciones con compuestos derivados de CS-E. Se empleó como disolvente una mezcla de DMSO/PBS (2:1) y  $\text{CuSO}_4$  (2 equiv.), TBTA (4 equiv.) y  $\text{AscNa}$  (6 equiv.). Además, se usó un exceso (3 equivalentes) del compuesto **34** para facilitar la

finalización de la reacción y una conversión total hacia el producto deseado

**35. (Figura 4.12)**



**Figura 4.12.** Síntesis del dendrón fluorescente **35**.

Una vez finalizada la reacción, se llevó a cabo una purificación usando Sephadex LH-20 en  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (9:1), seguida del empleo de resina DOWEX de intercambio iónico para obtener el dendrón fluorescente **35** como una sal sódica. La caracterización mediante espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear (**Figura 4.13**) permitió confirmar la estructura del compuesto **35**. Así, en la **Figura 4.13** se muestra la asignación de las señales del espectro HSQC del dendrón **35**, siguiendo la numeración indicada en la **Figura 4.12**.

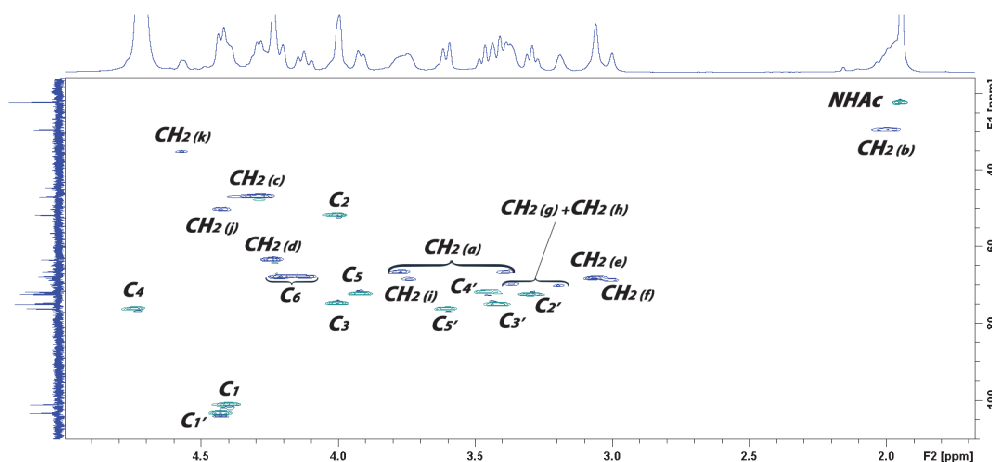


Figura 4.13. Espectro HSQC del compuesto **35**.

### 4.1.3. Síntesis de dendrímeros de segunda generación

Como se comentó al principio del capítulo, uno de los principales objetivos de la preparación del dendrón **30** es su utilización para la obtención de estructuras multivalentes de segunda generación como miméticos más similares a los polisacáridos naturales de CS-E. La estrategia empleada se basa en una síntesis convergente, en la cual, el disacárido de CS-E **1** se conjuga en primer lugar para dar el dendrón trivalente **30**. A continuación, se llevaba a cabo la reacción de cicloadición CuAAC entre dicho dendrón y los núcleos dendriméricos de valencia 3, 4 y 6, usados ya en esta Tesis Doctoral, para obtener los sistemas multivalentes de segunda generación que presentan 9, 12 y 18 ligandos disacarídicos en su estructura. Para abordar esta síntesis, se decidió emplear una ruta convergente debido a que, tal y como se indicó en el capítulo de introducción, la purificación de los productos sería, a priori, más sencilla, en comparación con una ruta



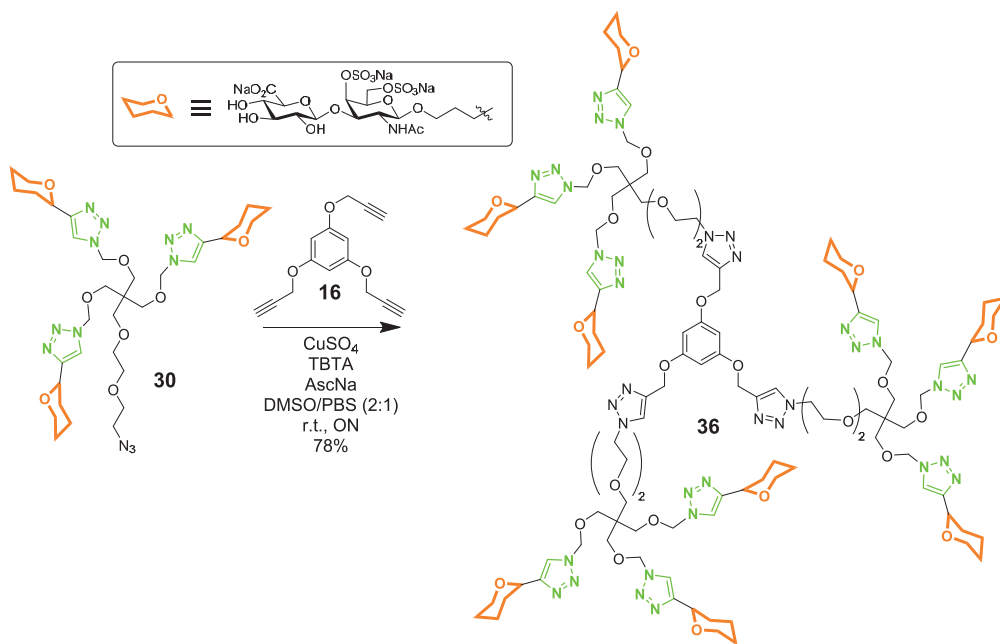
divergente, en el caso de que las reacciones de acoplamiento no se completaran.

Una vez diseñada la ruta de síntesis, y partiendo del dendrón **30** y de los núcleos **16**, **17** y **18**, se procedió a llevar a cabo la formación de los nuevos dendrímeros de segunda generación.

#### **4.1.3.1. Obtención de los dendrímeros de segunda generación, miméticos de CS-E, 36, 37 y 38**

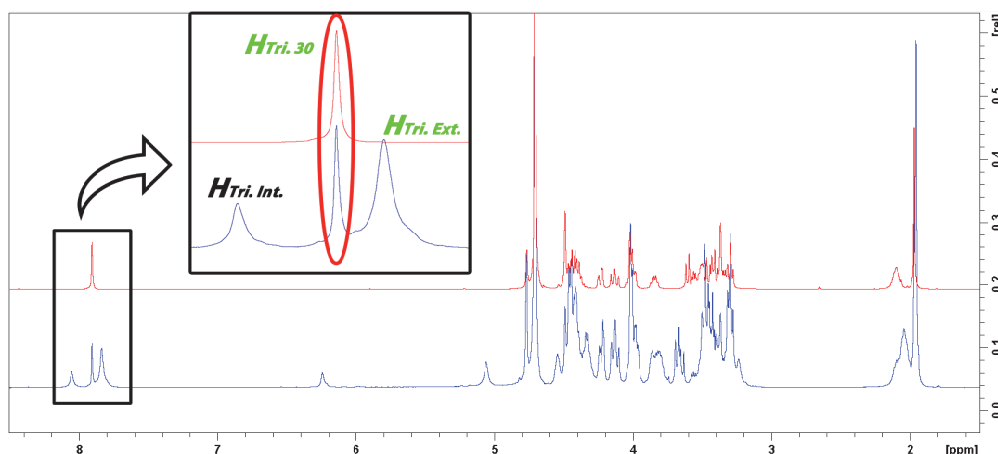
Para llevar a cabo la conjugación entre el dendrón **30** y los núcleos **16-18**, se emplearon condiciones de reacción similares a las usadas para la formación de los dendrímeros de primera generación. Pero en este caso, se tuvo que aumentar la cantidad de CuSO<sub>4</sub>, TBTA y AscNa para completar las reacciones de cicloadición, que presentaban, a priori, un mayor grado de dificultad por los impedimentos estéricos que pudieran presentarse debido al tamaño de los dendrones, y el aumento de cargas y grupos OH capaces de quelar el Cu.

Se comenzó explorando la formación del dendrímero de segunda generación más sencillo, el de valencia 9. Para ello, se hizo reaccionar el dendrón **30** con el núcleo trivalente **16**, utilizando 1.5, 3 y 4.5 equivalentes de CuSO<sub>4</sub>, TBTA y AscNa, respectivamente, por cada grupo alquino y empleando como disolvente una mezcla de DMSO/PBS(10 mM) 2:1. (**Figura 4.14**)



**Figura 4.14.** Síntesis del dendrímero de segunda generación **36**.

La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente, y el exceso de cobre se eliminó mediante el empleo de la resina Quadrasil MP. Tras una primera purificación a través de una columna de Sephadex LH-20 y otra columna de intercambio iónico con resina DOWEX  $\text{Na}^+$ , se obtuvo un compuesto que se analizó mediante  $^1\text{H}$ -RMN. (**Figura 4.15**)



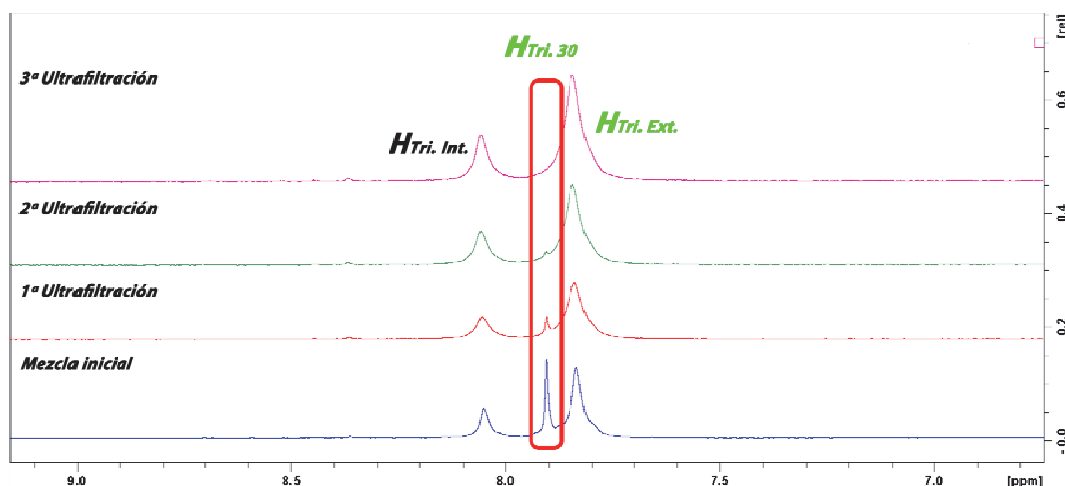
**Figura 4.15.** Superposición de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **30** (espectro rojo) y del dendrímero de 9 copias de CS-E **36** (espectro azul).  $\text{H}_{\text{Tri. 30}}$  corresponde a la señal del protón del triazol del dendrón **30**, y  $\text{H}_{\text{Tri. Int.}}$  y  $\text{H}_{\text{Tri. Ext.}}$  a las señales de los protones de los triazoles internos y externos del dendrímero **36**, respectivamente.

En la **Figura 4.15** se observa que el empleo de Sephadex no permitió purificar completamente el producto deseado, ya que se observaba en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN la presencia de señales características del dendrón **30** de partida. Así, en la zona del espectro donde suelen aparecer las señales correspondientes a los protones de los anillos de triazol, se observaban tres singletes: el del triazol del dendrón **30** de partida y 2 del dendrímero de 9 copias **36** correspondientes a los anillos de triazol internos (conexión entre el núcleo y los dendrones) y los anillos externos (triazoles procedentes del dendrón **30**), cuyas integrales presentaban una relación 1:3.

Con estos resultados, se hizo evidente la necesidad de buscar un nuevo método de purificación que permitiera separar el producto final **36** del dendrón de partida, ya que la diferencia de tamaño de sus respectivos pesos moleculares quedaba fuera del rango de separación de la Sephadex LH-20.

Para ello, se pensó en utilizar ultracentrifugación como método de separación. Para llevar a cabo dicha purificación, se emplearon tubos de centrifuga Amicon® Ultra-4 de 3kDa, que permitían la separación del dendrón **30**, con un peso de 2.5 kDa, y el dendrímero **36**, con un peso molecular aproximado de 7.7 kDa. Inicialmente se llevó a cabo un test con H<sub>2</sub>O miliQ, que permitió seleccionar los parámetros más adecuados para la purificación (velocidad de centrifugación de 7000 r.p.m. durante 10 minutos para un volumen de muestra de 4 mL), ya que el empleo de este tipo de tubos Amicon® de forma adecuada precisaba que el filtro no se secara durante el proceso de centrifugación.

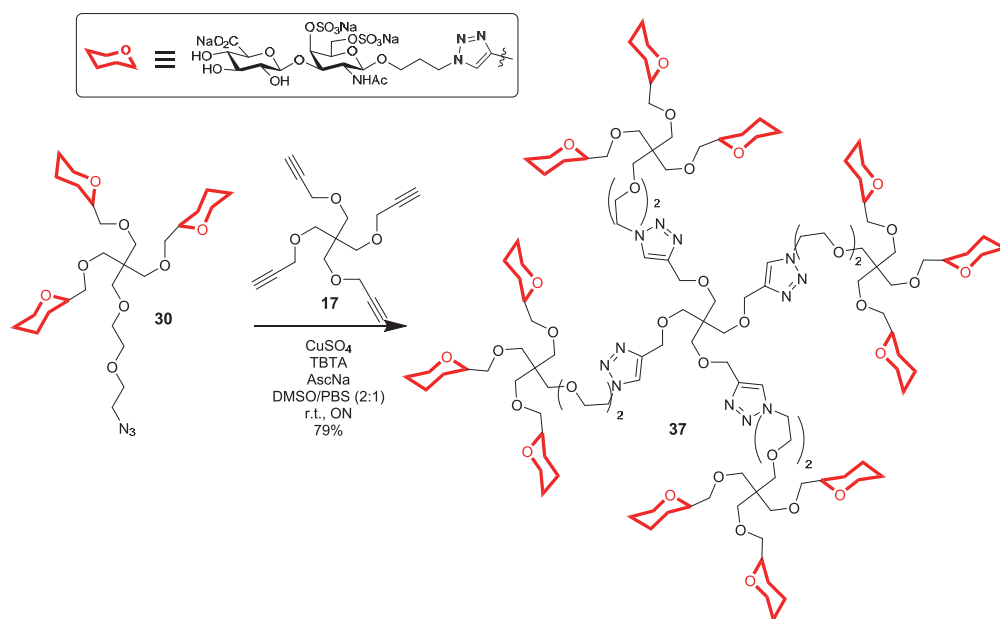
A continuación, la mezcla que contenía el dendrímero **36** y el dendrón de partida **30** se filtró usando estas condiciones, a través de un filtro previamente lavado con H<sub>2</sub>O miliQ. Este proceso se repitió hasta un total de tres veces, con el objeto de conseguir una separación total del dendrón de partida. Tras cada una de las sucesivas centrifugaciones, el producto retenido en el filtro se hizo pasar por una columna de intercambio iónico DOWEX Na<sup>+</sup> en H<sub>2</sub>O y se analizó por <sup>1</sup>H-RMN, observándose finalmente la completa desaparición de la señal del triazol correspondiente al dendrón de partida **30**. (**Figura 4.16**) De esta forma, se consiguió purificar el dendrímero de segunda generación con 9 copias de la unidad disacarídica de CS-E **36** como sal sódica con un 78% de rendimiento.



**Figura 4.16.** Superposición de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (zona de aparición característica de los protones de los anillos de triazol). El espectro azul corresponde a la mezcla inicial del producto **36** y el dendrón de partida **30**, y los espectros rojo, verde y rosa a los productos obtenidos tras las sucesivas ultracentrifugaciones.

Una vez obtenido el compuesto **36**, el trabajo posterior se encaminó a aumentar el número de copias de ligando en los sistemas multivalentes mediante el empleo de los núcleos de mayor valencia **17** y **18**, con el objeto de obtener dendrímeros más similares a los polisacáridos naturales de CS-E.

Para la formación del dendrímero con 12 copias disacáridicas, se hizo reaccionar el dendrón **30** con el núcleo tetravalente **17**. En este caso, se emplearon aproximadamente 1.75, 3.5 y 5.25 equivalentes de  $\text{CuSO}_4$ , TBTA y AscNa por cada grupo alquino, respectivamente. La reacción, al igual que en el caso anterior, se llevó a cabo en una mezcla DMSO/PBS(10 mM) 2:1. (Figura 4.17)

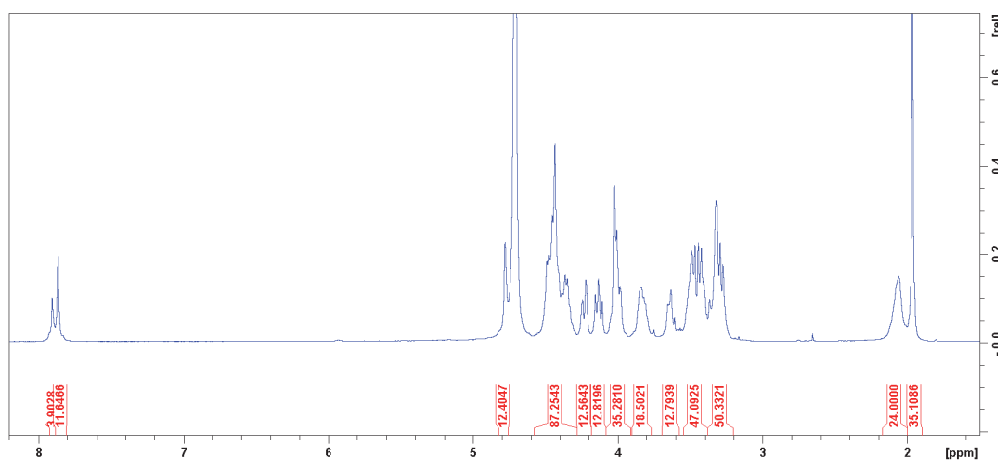


**Figura 4.17.** Síntesis del dendrímero de segunda generación **37**.

De la misma forma que en el caso del compuesto **36**, se eliminó el cobre de la reacción mediante el empleo de resina Quadrasil MP y la mezcla de reacción se pasó, posteriormente, a través de una columna de Sephadex LH-20 en  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  9:1. El empleo de esta última columna, no permitía separar el exceso de compuesto de partida **30** del producto final, pero sí permitía la eliminación del DMSO y de todas las sales y compuestos de reducido peso molecular para obtener finalmente la mezcla de dendrón y dendrímero **37**, como sales sódicas, tras tratamiento con la resina de intercambio iónico DOWEX  $\text{Na}^+$ .

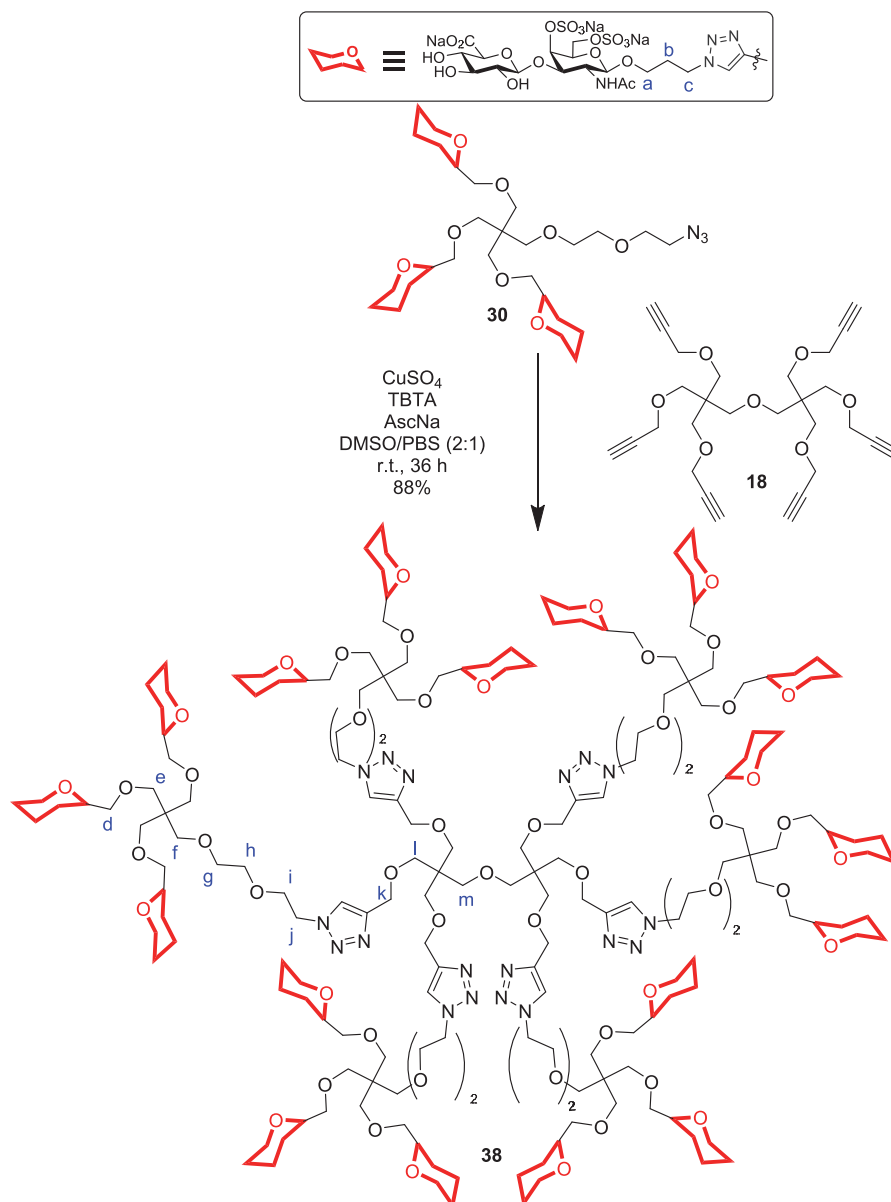
A continuación, se llevó a cabo la purificación por ultrafiltración. De nuevo, se emplearon los filtros Amicon® comerciales de tamaño de corte de 3 kDa, siguiendo el procedimiento puesto a punto (7000 r.p.m., 4 mL de muestra, 10 min) para el compuesto **36**. Tras tres filtraciones de la mezcla de

reacción en dichas condiciones, se obtuvo el correspondiente dendrímero **37** puro (79%). (Figura 4.18)



**Figura 4.18.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **37** tras purificación.

Por último, se preparó el dendrímero de 18 copias disacarídicas de CS-E. Para ello, se hizo reaccionar el dendrón **30** con el núcleo hexavalente **18**, empleando en este caso 3.3, 6.6 y 10 equivalentes por valencia de  $\text{CuSO}_4$ , TBTA y AscNa, respectivamente. (Figura 4.19)

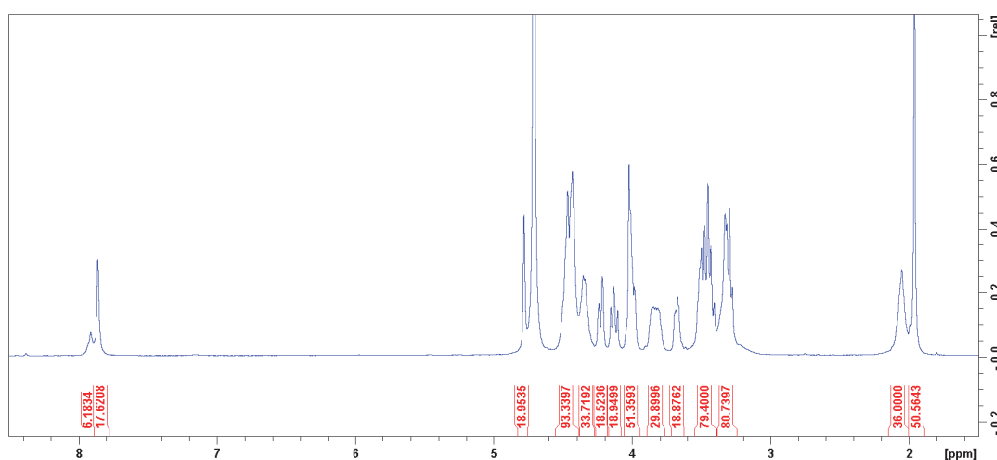


**Figura 4.19.** Síntesis del dendrímero de segunda generación **38**.

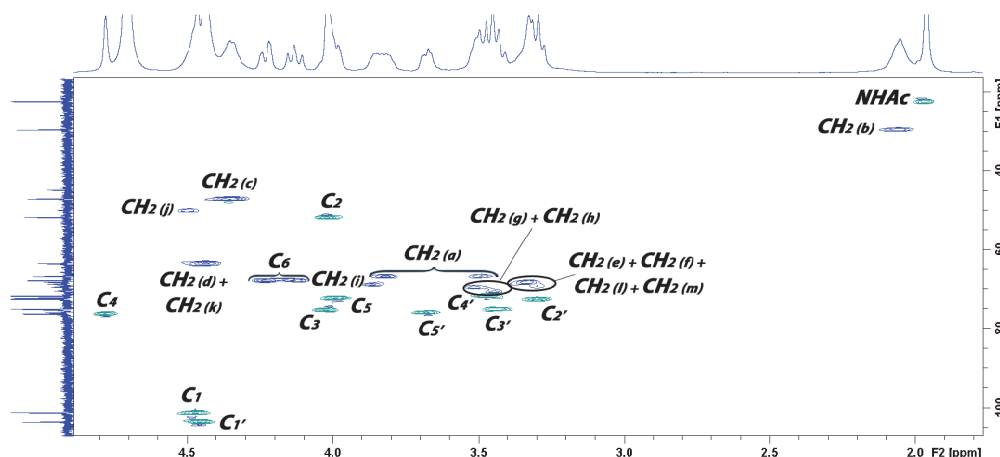
Tras agitar a temperatura ambiente durante 36 horas, el crudo de reacción se trató con la resina Quadrasil MP y se purificó a través de una columna de Sephadex LH-20 y otra con una resina de intercambio iónico DOWEX  $\text{Na}^+$ , al igual que con los anteriores dendrímeros. La diferencia entre los pesos



moleculares del dendrón **30** (2.5 kDa) y el dendrímero **38** (15.4 kDa) permitió emplear, en este caso, tubos de centrifuga Amicon® comerciales con filtros de 10 kDa de corte. Las condiciones de centrifugación óptimas fueron de 7000 r.p.m., para un volumen de muestra de 4 mL y un tiempo de centrifugación de 5 minutos. De esta manera, tras ultracentrifugar la muestra tres veces, se obtuvo puro el dendrímero **38** con 18 copias de disacárido de CS-E con un rendimiento del 88%. En las **Figuras 4.20 y 4.21** se presentan los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y HSQC bidimensional del compuesto **38**.



**Figura 4.20.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del dendrímero **38**.



**Figura 4.21.** Espectro bidimensional HSQC del dendrímero **38**. Se emplea la numeración habitual del disacárido y la mostrada para los grupos CH<sub>2</sub> en la **Figura 4.19**.

Una vez obtenidos los dendrímeros de segunda generación **36**, **37** y **38** con buen rendimiento y caracterizados empleando técnicas de resonancia magnética nuclear, el siguiente paso consistió en emplear la espectrometría de masas para confirmar la estructura de dichos compuestos.

#### 4.1.3.2. Caracterización mediante espectrometría de masas MALDI-ToF de los dendrímeros de segunda generación **36**, **37** y **38**

La caracterización por espectrometría de masas de glicosaminoglicanos es una tarea compleja debido a la alta polaridad y al gran número de cargas negativas presentes en estos compuestos.<sup>97</sup> El análisis de GAGs por

<sup>97</sup> a) Ohara, K.; Jacquinet, J. C.; Jouanneau, D.; Helbert, W.; Smietana, M.; Vasseur, J. J. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2009**, *20*, 131-137; b) Jones, C. J.; Beni, S.; Limtiaco, J. F. K.; Langeslay, D. J.; Larive, C. K. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2011**, *4*, 439-465.

espectrometría de masas presenta problemas debidos a la baja capacidad de ionización de estos carbohidratos y a la obtención de picos procedentes de la pérdida de los grupos sulfato. Además, la interpretación de los espectros es muy compleja debido a la aparición de iones con múltiple carga y a la formación de aductos con diferentes combinaciones de contraiones. Así, aunque para la determinación estructural de los compuestos sintetizados en capítulos anteriores, se pudieron llevar a cabo espectros de masas mediante ionización por eletrospray (ESI), en el caso de los dendrímeros de segunda generación descritos en el presente capítulo, con un mayor número de cargas negativas, fue necesario emplear técnicas alternativas para la caracterización de dichos compuestos mediante espectrometría de masas.

En 1995, Juhasz y Biemann<sup>98</sup> publicaron un procedimiento que permitía la obtención de espectros MALDI-ToF de compuestos oligosacáridos derivados de heparina mediante su complejación iónica con determinados péptidos básicos. De esta manera, se formaban complejos entre los péptidos de secuencia (Arg-Gly)<sub>n</sub>, cargados positivamente, y los oligosacáridos, permitiendo la ionización y la detección de los complejos formados. Para determinar el peso molecular de los oligosacáridos, se sustraía la masa del péptido de la masa total del complejo detectado. En 2001, nuestro grupo de investigación puso en práctica dicho método para la determinación mediante espectrometría de masas de derivados oligosacáridos de heparina.<sup>99</sup> Adicionalmente, proteínas de bajo peso molecular, que

---

<sup>98</sup> Juhasz, P.; Biemann, K. *Carbohydr. Res.* **1995**, 270, 131-147.

<sup>99</sup> de Paz, J. L.; Angulo, J.; Lassaletta, J. M.; Nieto, P. M.; Redondo-Horcajo, M.; Lozano, R. M.; Gimenez-Gallego, G.; Martin-Lomas, M. *ChemBioChem* **2001**, 2, 673-685.

reconocen GAGs han sido también empleadas para la formación de los correspondientes complejos y su detección mediante MALDI-ToF.<sup>100</sup>

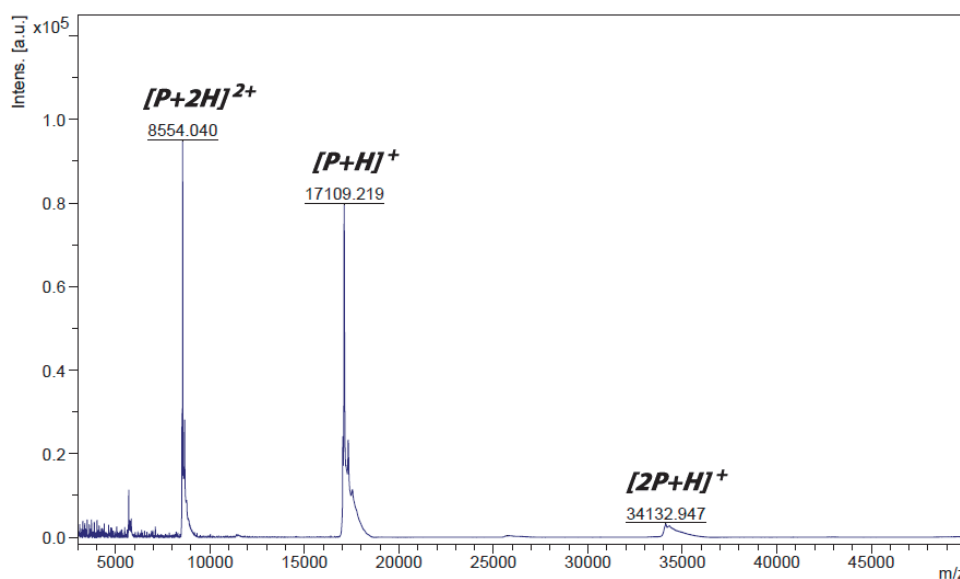
Así, para la caracterización de nuestros dendrímeros de segunda generación se decidió llevar a cabo, en primer lugar, espectros de masas MALDI-ToF de los complejos entre dichos sistemas multivalentes y proteínas como la Midkina y el FGF-2 (factor de crecimiento para fibroblastos básico). Estos experimentos aportarían información por partida doble, ya que permitirían demostrar la interacción entre los nuevos dendrímeros y dichas proteínas, a la vez que se obtenía la masa de los compuestos. Para la formación de los complejos se eligieron inicialmente como proteínas, la Midkina, cuya interacción con los dendrímeros de CS-E fue demostrada en el capítulo 3 de la presente Tesis, y el FGF-2, debido a la existencia de trabajos en la bibliografía<sup>101,102</sup> que mostraban su interacción con derivados de tipo GAG. Sin embargo, los primeros intentos de detección por MALDI-ToF de complejos entre la Midkina y nuestros dendrímeros no dieron resultados positivos, por lo que decidimos centrarnos en los complejos con FGF-2. A modo de referencia, en la **Figura 4.22** se muestra el espectro de MALDI-ToF de esta proteína, donde se puede observar tanto el ión molecular del FGF-2  $[P+H]^+$ , como la proteína con dos cargas  $[P+2H]^{2+}$  y el dímero  $[2P+H]^+$ .

---

<sup>100</sup> Venkataraman, G.; Shriver, Z.; Davis, J. C.; Sasisekharan, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1892-1897.

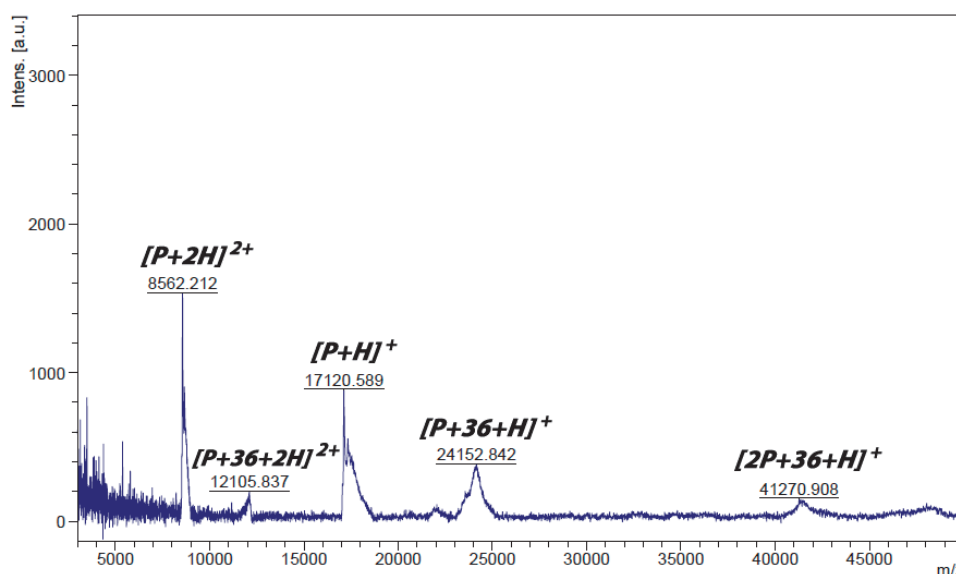
<sup>101</sup> Maza, S.; Gandía-Aguado, N.; de Paz, J. L.; Nieto, P. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *5*, 1076-1085.

<sup>102</sup> a) Faham, S.; Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Linhardt, R. J.; Rees D. C. *Science* **1996**, *271*, 1116-1120; b) Li, Y. C.; Ho, I. H.; Ku, C. C.; Ku, C. C.; Zhong, Y. Q.; Hu, Y. P.; Chen, Z. G.; Chen, C. Y.; Lin, W. C.; Zulueta, M. M. L.; Hung, S. C.; Lin, M. G.; Wang, C. C.; Hsiao, C.D. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1712-1717.



**Figura 4.22.** Espectro de MALDI-ToF de FGF-2. *P* hace referencia al peso molecular de la proteína que se corresponde con aproximadamente 17.1 kDa.

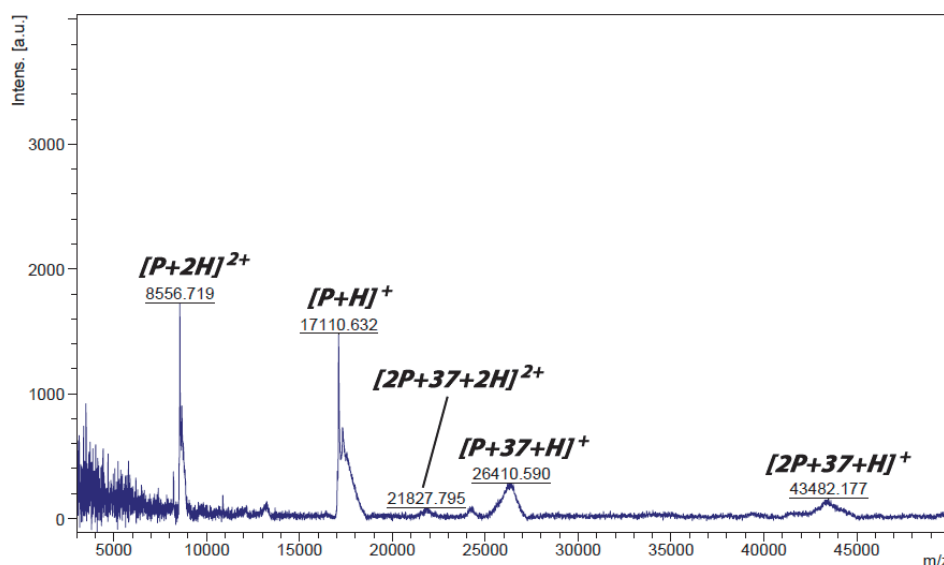
A continuación, se procedió a realizar las medidas de los complejos de FGF-2 con los dendrímeros **36**, **37** y **38**. El análisis comenzó con el más pequeño de los nuevos compuestos, ya que al disponer de una menor carga negativa neta, se esperaba una mayor facilidad para su ionización y detección. Por un lado, se mezcló el compuesto **36** con la matriz (ácido sinapínico) en presencia de un 0.1% de ácido trifluoroacético. A continuación, se añadió, con una estequiometría 1:1, el factor de crecimiento FGF-2. La mezcla resultante se agitó y se registró el espectro de masas del complejo formado. (Figura 4.23)



**Figura 4.23.** Espectro MALDI-ToF de los complejos formados por el factor de crecimiento FGF-2 y el dendrímero con 9 copias disacarídicas, **36**.

Como puede observarse en la **Figura 4.23**, se detectaron picos correspondientes a los complejos del factor de crecimiento y el dendrímero con estequiometría 1:1 y 2:1, de los que se dedujo un peso molecular de aproximadamente 7-7.1 kDa, que se corresponde con el valor teórico calculado para el dendrímero **36**.

Teniendo en cuenta el resultado obtenido con el más pequeño de los nuevos dendrímeros, se decidió repetir el procedimiento con los otros dos compuestos de mayor valencia. Así, el complejo formado entre el compuesto **37** y el factor de crecimiento FGF-2, mezclados en proporción 1:1 y usando ácido sinapínico como matriz, proporcionó el espectro de masas de la **Figura 4.24**, donde pueden observarse los diversos picos asociados a la formación de complejos entre la proteína y el ligando con cargas +1 y +2.

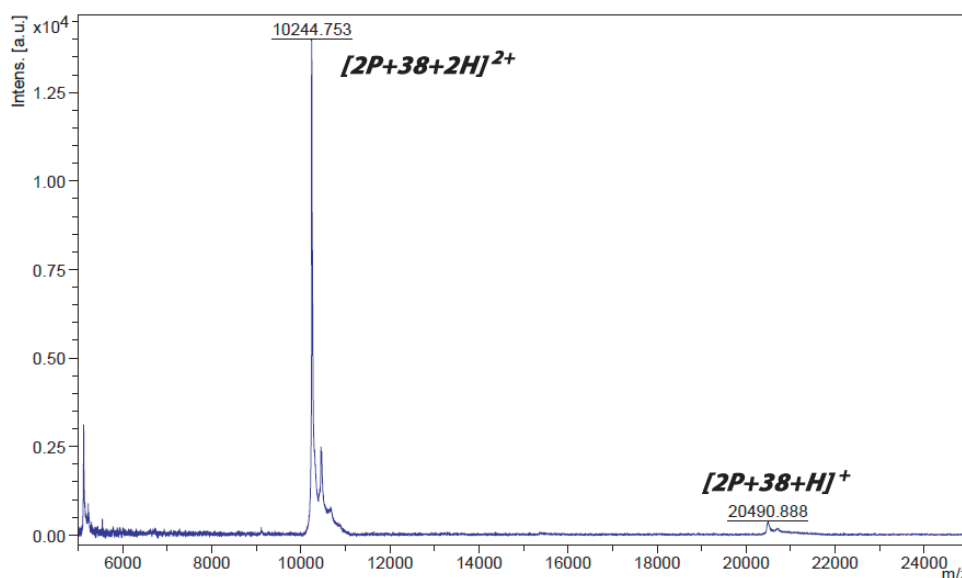


**Figura 4.24.** Espectro de MALDI-ToF de los complejos formados por el factor de crecimiento FGF-2 y el dendrímero con 12 copias disacarídicas, **37**.

Del anterior espectro se deduce un peso molecular de 9.3 – 9.4 kDa para el compuesto **37**, que se corresponde con la masa teórica del dendrímero en cuestión.

Por último, se repitió dicho experimento con el dendrímero **38**, con 18 copias disacarídicas. Tras una serie de ensayos donde se probaron varias matrices y estequiometrías proteína/dendrímero, en busca de la obtención y detección de los complejos, no se obtuvieron resultados reseñables. Por ello, se planteó la utilización del mismo péptido de secuencia (Arg-Gly)<sub>n</sub>, empleado en un trabajo anterior por nuestro grupo de investigación.<sup>99</sup> Este péptido consistía en una secuencia de aminoácidos compuesta por 15 unidades de repetición arginina-lisina y fue sintetizado por el Servicio de Síntesis de Péptidos de la Facultad de Química de la Universidad de Barcelona. En este ensayo se mezclaron, en proporción estequiométrica 1:1,

el dendrímero **38** y el péptido, en presencia de un 0.1% de ácido trifluoroacético y utilizando como matriz el ácido sinapínico. De esta forma, se obtuvo como resultado el espectro de masas que aparece en la **Figura 4.25**.



**Figura 4.25.** Espectro de MALDI-ToF del complejo formado por el péptido (Arg-Gly)<sub>15</sub> y el dendrímero **38**, con 18 copias disacarídicas.

En la **Figura 4.25** se puede observar la formación de un complejo 2:1 entre el péptido y el dendrímero. Teniendo en cuenta que el péptido tiene un peso molecular de 3215 Da, podemos deducir que se ha formado un complejo con una molécula cuyo peso molecular aproximado es de 14.1 kDa, que se corresponde con la masa teórica del compuesto **38**.

En resumen, a lo largo del presente capítulo se ha desarrollado una metodología sintética para la formación de dendrímeros de segunda generación, empleando una estrategia convergente a partir de dendrones funcionalizados ortogonalmente en su posición focal. Con el fin de



mimetizar de forma más próxima a la realidad a los polisacáridos naturales, se ha aumentado la valencia de las estructuras sintetizadas, desarrollando nuevas moléculas dendríticas que presentan 9, 12 y 18 copias disacáridicas de CS-E, con pesos moleculares entre 7 y 15 kDa. Se ha optimizado la purificación de estos sistemas, mediante ultracentrifugación, empleando filtros comerciales Amicon®. También se ha estudiado la funcionalización selectiva de la posición focal de dichos dendrones con un derivado de fluoresceína para la obtención de moléculas fluorescentes para diversas aplicaciones biológicas.

Por último, se ha desarrollado una metodología para la caracterización, por espectrometría de masas MALDI-ToF, de las macroestructuras dendriméricas miméticas de CS-E sintetizadas, que se basa en la formación de complejos entre dichos sistemas y péptidos o proteínas de carácter básico. Este análisis sirve como herramienta, junto a los experimentos de resonancia magnética nuclear, para determinar la estructura de los compuestos sintetizados, resolviendo los problemas inherentes al análisis basado en la espectrometría de masas convencional.



## **CAPÍTULO 5.**

# **INTERACCIÓN DE SISTEMAS MULTIVALENTES DENDRIMÉRICOS DE CS-E CON LANGERINA.**



## **5.1. Introducción**

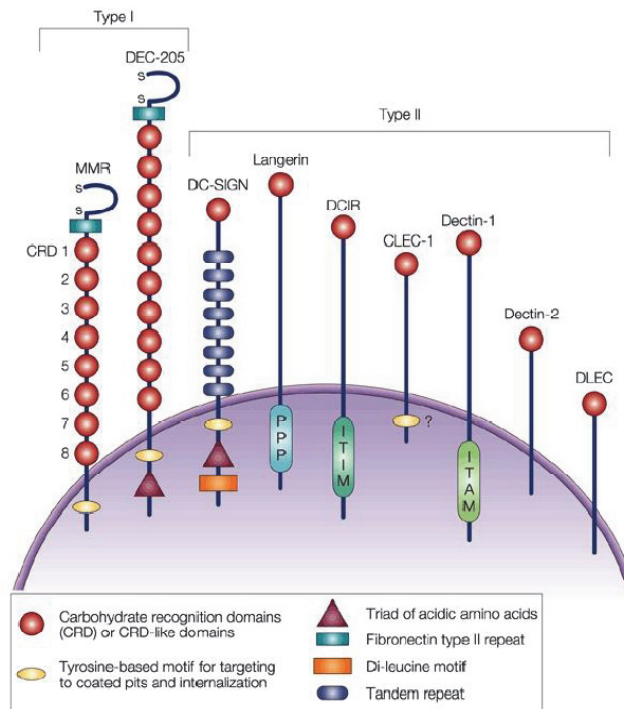
### **5.1.1. Lectinas de tipo C: La Langerina**

La Langerina pertenece a la familia de las lectinas, proteínas que intervienen en procesos de reconocimiento de carbohidratos con una elevada especificidad. En concreto, la Langerina es una lectina de tipo C, designación que hace referencia a la necesidad de la presencia de átomos de  $\text{Ca}^{+2}$  para interaccionar selectivamente con los carbohidratos y ejercer su función. Este tipo de proteínas suelen estar involucradas en el sistema inmune, siendo consideradas como la primera barrera de defensa, a través del reconocimiento de patógenos o antígenos. Dentro de las lectinas de tipo C, las más conocidas son aquellas expresadas por las células dendríticas (DCs) o las células de Langerhans (LCs), que se encuentran en la piel y en las mucosas de los mamíferos. Dichas células expresan en la matriz extracelular diferentes tipos (I y II) de proteínas transmembranales, tal y como puede observarse en la **Figura 5.1**.

La principal diferencia entre estos tipos de proteínas radica en el número de dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs) que presentan: las del tipo I, poseedoras de varios CRDs; y las del tipo II, con un único dominio de reconocimiento.<sup>103</sup>

---

<sup>103</sup> Figdor, C. D.; van Kooyk, Y.; Adema, G. J. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, 2, 77-84.

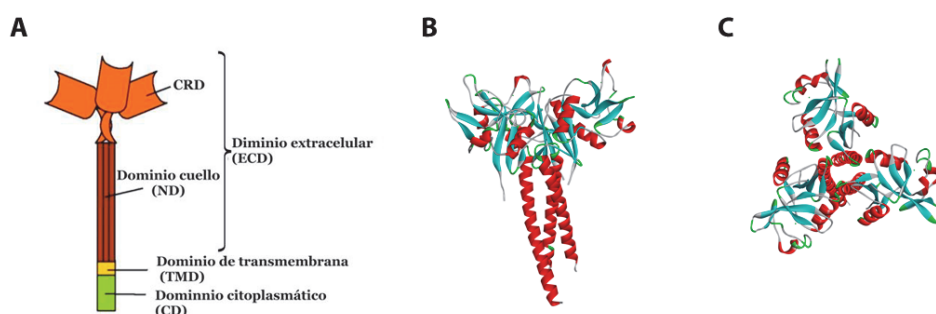


**Figura 5.1.** Representación de las diferentes clases de lectinas tipo C presentes en la superficie celular de DCs o LCs. Imagen extraída de “*Nat. Rev. Immunol.* **2002**, 2, 77-84.”

Tal y como puede observarse en la figura anterior, la Langerina, expresada por las LCs, formaría parte del conjunto de lectinas de tipo II, ya que únicamente dispone de un CRD.<sup>104</sup> Al ser una proteína transmembranal, dispone de tres dominios (**Figura 5.2**): el dominio citoplasmático que se encuentra en el interior celular y está compuesto por un conjunto de 43 aminoácidos enriquecidos en prolina y que finaliza en el terminal amino; el dominio transmembranal, compuesto por 20 aminoácidos; y por último, el dominio extracelular, denominado ECD, que se encuentra dividido a su vez en el sitio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), compuesto por secuencias de glutámico/prolina/asparagina y cuya interacción con azúcares

<sup>104</sup> Merad, M.; Ginhoux, F.; Collin, M. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, 8, 935-947.

es dependiente de la presencia de iones calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), y una secuencia peptídica en forma de hélices alfa, que constituye el dominio cuello (ND). Dicha secuencia está compuesta por una repetición de leucinas y permite la trimerización de las cadenas hélice alfa y la consiguiente trimerización de los dominios CRD de la Langerina.<sup>105</sup> (**Figura 5.2**)

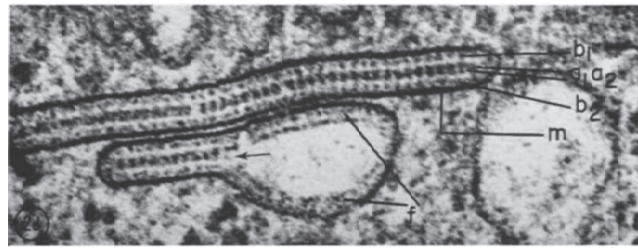


**Figura 5.2.** A) Esquema de los diferentes dominios de la Langerina. B) Representación de la estructura tridimensional del homotrímero de la Langerina. C) Representación de los dominios de reconocimiento de carbohidratos (CDR) del trímero de la Langerina. Las imágenes B y C han sido extraídas de "*Mol. Immunol.* **2008**, 45, 1981-1994. View obtained by PDB:3KQG in "BIOVIA Discovery Studio 4.5©" program."

Las lectinas de tipo C son capaces de reconocer selectivamente diferentes tipos de carbohidratos. Mediante estas interacciones, la Langerina captura diversos patógenos y facilita su posterior internalización y eliminación en unos orgánulos celulares denominados gránulos de Birbeck. (**Figura 5.3**) Este proceso mediado por Langerina ha demostrado ser la primera línea de defensa contra las infecciones producidas por el VIH (virus de inmunodeficiencia humana) a través de las mucosas.<sup>106</sup>

<sup>105</sup> Valladeau, J.; Dezutter-Dambuyant, C.; Saeland, S. *Immunol. Res.* **2003**, 28, 93-107.

<sup>106</sup> de Witte, L.; Nabatov, A.; Pion, M.; Fluitsma, D.; de Jong, M. A. W. P.; de Grujil, T.; Piguet, V.; van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. B. H. *Nat. Med.* **2007**, 13, 367-371.



**Figura 5.3.** Gránulos de Birbeck en células de Langerhans observados por microscopía electrónica. Imagen extraída de “*J. Cell. Biol.* **1967**, 35, 468-473.”

La implicación de esta lectina en la infección por el VIH, mediante la formación de los gránulos de Birbeck para su consiguiente degradación, pone de manifiesto la importancia de abordar estudios químicos, biológicos y estructurales que permitan obtener una mayor comprensión acerca del papel que desempeñan las interacciones entre esta lectina y los carbohidratos en dichos procesos biológicos.

Como se mencionó anteriormente, la Langerina dispone de un sitio de interacción para carbohidratos,<sup>107</sup> dependiente de calcio, en el dominio CRD, por el que esta lectina reconoce específicamente residuos de manosa o *N*-acetilglucosamina, mediante la interacción con los hidroxilos 3 y 4, de configuración diecuatorial, que poseen estos azúcares. Además de este sitio de reconocimiento dependiente de calcio, común a todas las lectinas tipo C, la Langerina tiene la particularidad de reconocer ligandos sulfatados, como los GAGs, a través de un sitio de reconocimiento alternativo, independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , que se localiza en la interfase entre los dominios CRD de la Langerina.<sup>108,109</sup> **(Figura 5.4)** Se ha demostrado que la interacción entre la

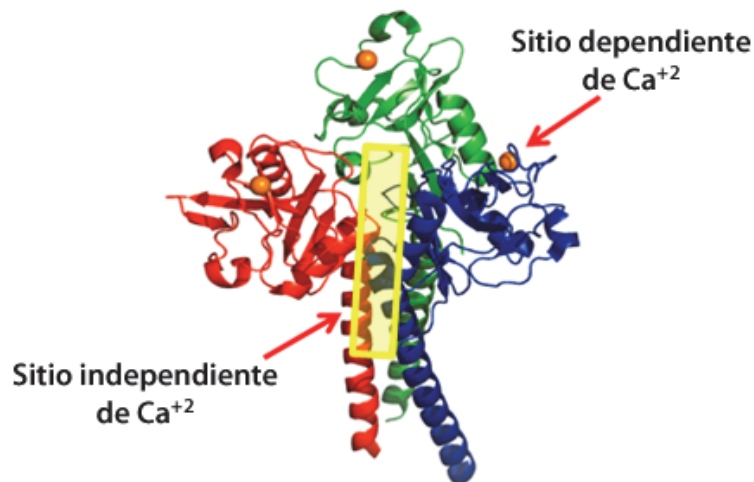
<sup>107</sup> Taylor, M. E.; Drickamer, K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, 28, 14-22.

<sup>108</sup> Muñoz-García, J. C.; Chabrol, E.; Vives, R. R.; Thomas, A.; de Paz, J. L.; Rojo, J.; Imberty, A.; Fieschi, F.; Nieto, P. M.; Angulo, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 4100-4110.

<sup>109</sup> Chabrol, E.; Nurisso, A.; Daina, A.; Vassal-Stermann, E.; Thepaut, M.; Girard, E.; Vivès, R. R.; Fieschi, F. *PLOS ONE* **2012**, 7, e50722.



Langerina y los GAGs, a través de dicho sitio, es esencial para la formación de los gránulos de Birbeck durante el reconocimiento y la neutralización de los patógenos. Sin embargo, no se conocen en detalle los requerimientos estructurales mínimos necesarios para que la interacción Langerina-GAG tenga lugar.



**Figura 5.4.** Representación del sitio dependiente e independiente de  $\text{Ca}^{+2}$  en la lectina Langerina. Imagen extraída de: "*J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 13285-13293."

Así, para profundizar en los conocimientos que se tienen actualmente acerca de este tipo de interacciones, en esta Tesis Doctoral se pretende usar dendrímeros de CS-E como herramientas para estudiar la interacción con Langerina a nivel molecular y determinar el mecanismo del reconocimiento GAG-Langerina.

## 5.2. Resultados y discusión

### 5.2.1. Estudios de interacción dendrímero-Langerina

Inicialmente se evaluó la posibilidad de llevar a cabo un estudio de interacción entre los dendrímeros miméticos del CS-E y la Langerina mediante experimentos de competición de polarización de fluorescencia como los realizados con la Midkina en el Capítulo 3 de la presente Tesis. Sin embargo, dicha técnica no pudo ser empleada debido a la débil interacción observada entre la sonda fluorescente y la Langerina. Por ello, se decidió emplear técnicas de RMN para analizar las interacciones dendrímero-Langerina.

#### 5.2.1.1. Estudios de interacción dendrímero-Langerina

##### mediante técnicas de RMN.

Las técnicas de resonancia magnética nuclear están especialmente indicadas para el estudio de interacciones débiles proteína-ligando, en el rango  $\mu\text{M}$  – mM, rango en el que se encuentra la interacción Langerina-GAGs.<sup>110</sup>

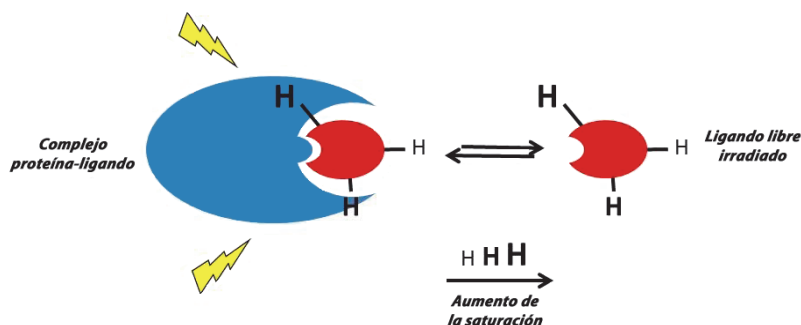
Así, en nuestro grupo de investigación, en colaboración con el Dr. Pedro M. Nieto, se realizaron experimentos de RMN basados en la observación de la transferencia de magnetización de la proteína al ligando, para el análisis de las interacciones entre la Langerina y los dendrímeros de CS-E sintetizados.

---

<sup>110</sup> Becker, W.; Bhattacharya, K. C.; Gubensäk, N.; Zangger, K. *ChemPhysChem* **2018**, *19*, 895-906.

En concreto, se llevaron a cabo experimentos de STD<sup>111</sup> (diferencia de transferencia de saturación), técnica basada en la observación del ligando que permite evaluar la interacción entre un ligando de bajo peso molecular y una proteína de alto peso molecular.

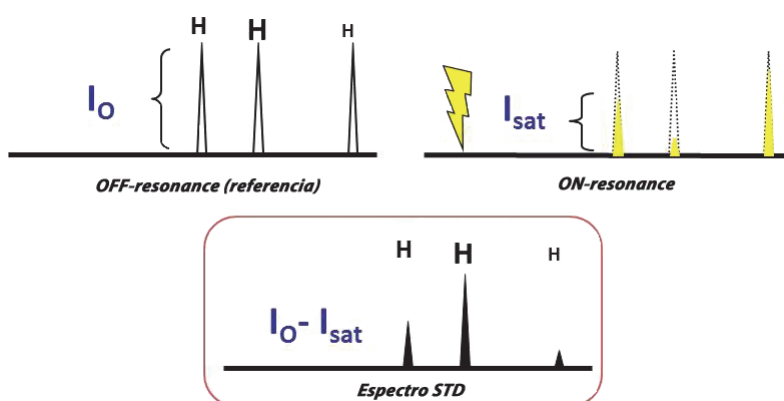
En este experimento se emplea un exceso de ligando (el carbohidrato, en este caso), lo que impide la observación de las señales de la proteína y permite la observación exclusiva de las señales del ligando. En un experimento de STD (**Figura 5.5**) se irradia en una zona del espectro donde hay señales de la proteína pero no del ligando. Así, cuando se forma el complejo proteína-ligando, la irradiación se transfiere de la proteína al ligando y al disociarse, el ligando lo hace con la magnetización adquirida anteriormente en el estado enlazado. De esta forma, la magnetización de cada protón del ligando cambia en función de la geometría del estado enlazado, adquiriendo una mayor magnetización aquellos protones que interactúan más con la proteína. (**Figura 5.5**)



**Figura 5.5.** Representación esquemática de un experimento de STD.

<sup>111</sup> a) Mayer, M.; Meyer, B. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1999**, 38, 1784-1788; b) Meyer, B.; Peters, T. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2003**, 42, 864-890; c) Angulo, J.; Enriquez-Navas, P. M.; Nieto, P. M. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 7803-7812.

Para llevar a cabo los experimentos de STD, en primer lugar, se registra un espectro de referencia únicamente con el ligando (OFF resonance, **Figura 5.6**). A continuación, se registra el espectro ON resonance, irradiando exclusivamente en una zona donde resuenan los protones correspondientes a la proteína, observando que los protones del ligando más implicados en la interacción, y que por lo tanto reciben una mayor transferencia de saturación, disminuyen su intensidad en el espectro. La diferencia entre los espectros OFF y ON resonance se denomina espectro de STD. (**Figura 5.6**) De esta forma, las intensidades de las señales del espectro STD son proporcionales a la implicación, en la interacción con la proteína, de cada uno de los protones del ligando.

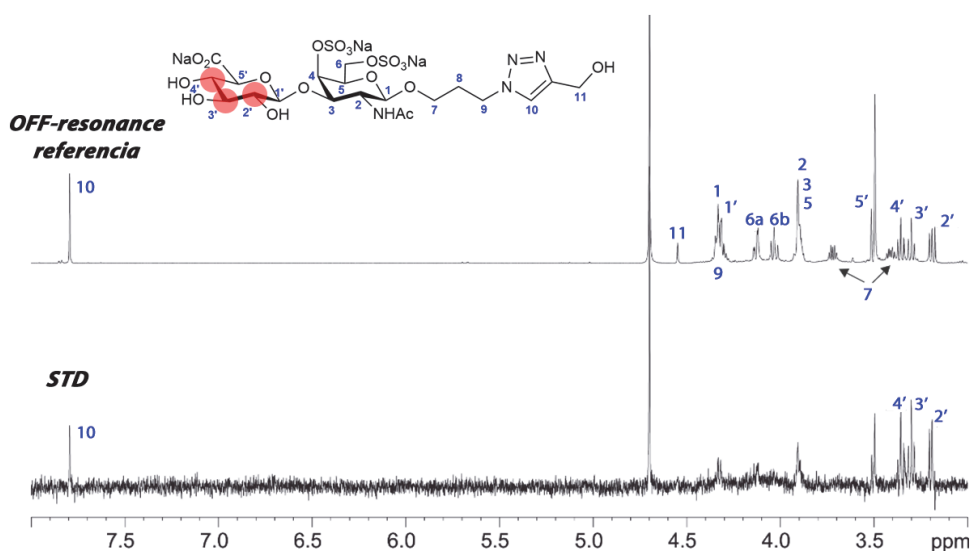


**Figura 5.6.** El espectro de STD se define como la diferencia entre el espectro de referencia OFF-resonance y el espectro ON-resonance.

Así, se abordaron los experimentos de STD de la Langerina con el ligando monovalente **26** y los dendrímeros de primera generación sintetizados en el Capítulo 3, **22**, **23** y **24**, con 3, 4 y 6 copias del disacárido mimético de CS-E, respectivamente.

Teniendo en cuenta, como se mencionó anteriormente, la existencia de al menos dos sitios de reconocimiento para carbohidratos en la Langerina, uno de ellos dependiente de la presencia de iones  $\text{Ca}^{+2}$  (CRD) y otro, independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , se optó por llevar a cabo los experimentos en dos condiciones diferentes. La primera medida se realizó en un tampón que contenía iones  $\text{Ca}^{+2}$ , mientras que para la segunda medida se añadió un exceso de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para complejar todos los cationes  $\text{Ca}^{+2}$ , impidiendo la interacción por medio del CRD de la lectina.

En primer lugar, se llevó a cabo el experimento de STD con el ligando monovalente **26** y la Langerina. (Figura 5.7)

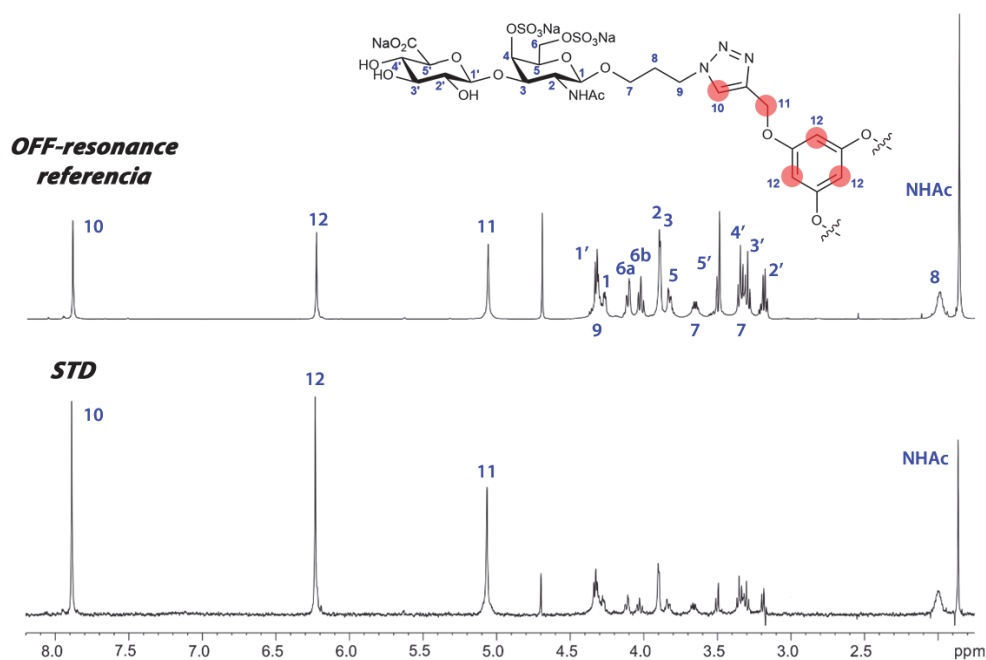


**Figura 5.7.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de referencia del compuesto **26** (arriba) y de STD (abajo) con la Langerina en presencia de iones  $\text{Ca}^{+2}$ . En rojo se indican los protones que muestran una mayor interacción con la lectina.

Como puede observarse en la figura anterior, el experimento de STD en presencia de calcio indica que el ligando monovalente interacciona con la Langerina principalmente a través de los protones 2, 3 y 4 del terminal no

reductor del disacárido. Tras la adición de EDTA, se observó la desaparición de las señales de STD, lo que confirmó que la unión entre **26** y la Langerina se producía a través del lugar de reconocimiento de carbohidratos (CRD), dependiente de iones calcio.

A continuación, se realizó el experimento STD con el dendrímero trivalente **22**, obteniéndose el resultado que se muestra en la **Figura 5.8**.



**Figura 5.8.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN de referencia del compuesto **22** (arriba) y de STD (abajo) con la Langerina en presencia de iones Ca<sup>+2</sup>. En rojo se indican los protones que muestran una mayor interacción con la lectina.

A diferencia de lo ocurrido con el disacárido **26**, las señales que aparecen en el experimento de STD se siguieron observando tras la adición de EDTA. Por lo tanto, este hecho indicaba que la interacción del dendrímero **22** con la Langerina ocurría tanto en presencia como en ausencia de iones Ca<sup>+2</sup>. Además, la unión del dendrímero con la proteína se producía

fundamentalmente a través del núcleo aromático y de los triazoles, y no a través del GlcA del terminal no reductor del disacárido. Todo ello indica que la interacción se produce, al menos en parte, en el sitio independiente de calcio, es decir, en el canal formado entre los dominios CRD del trímero de la Langerina, que se extiende hasta las hélices alfa del cuello de la proteína.

Finalmente, los experimentos de STD con los dendrímeros tetravalente y hexavalente **23** y **24** también confirmaron su interacción con Langerina mediante el sitio independiente de calcio, característico del reconocimiento de GAGs por esta lectina. Sin embargo, se encontraron dificultades para interpretar los resultados del STD y para definir los protones que muestran una mayor interacción con la lectina, ya que dichos compuestos multivalentes no se comportaban como moléculas pequeñas debido a su tamaño.

En resumen, los experimentos de STD RMN revelan dos modos de interacción diferentes para las moléculas derivadas de CS-E, dependiendo de su tamaño, lo que está de acuerdo con resultados previos de nuestro grupo.<sup>108</sup> El ligando disacárido monovalente interacciona con el sitio de reconocimiento dependiente de calcio de la Langerina, a través de los hidroxilos 2, 3 y 4 de su terminal no reductor. En cambio, los sistemas dendriméricos interaccionan, al menos en parte, con el sitio independiente de calcio de la lectina, comportándose como miméticos de los polisacáridos GAG naturales.

Las dificultades que presentaban los experimentos de STD con nuestros sistemas multivalentes miméticos de CS-E, con un peso molecular considerable, nos llevaron a explorar la síntesis de dendrímeros con uno o varios átomos de flúor en su estructura, con el objetivo de desarrollar

experimentos de RMN que permitieran un análisis alternativo de su interacción con Langerina.

#### 5.2.1.2. Síntesis de dendrímeros marcados con átomos de flúor.

El estudio de las interacciones moleculares responsables de los procesos de reconocimiento carbohidrato-proteína es un campo que actualmente genera un enorme interés en el ámbito científico.<sup>112</sup> Por lo tanto, los avances tecnológicos y la aplicación de nuevas metodologías que permitan el análisis de este tipo de interacciones tiene un gran interés.

Con el objetivo de utilizar nuevas aproximaciones de resonancia magnética nuclear para llevar a cabo los estudios de interacción Langerina-dendrímero, se decidió introducir uno o varios átomos de flúor en nuestros derivados de CS-E, ya que la presencia de un núcleo activo en RMN adicional al  $^1\text{H}$ , como es el  $^{19}\text{F}$ , resulta muy útil para la observación y monitorización de las interacciones.

En este sentido, el grupo de investigación del doctor Jesús Jiménez Barbero ha propuesto en los últimos años el uso de grupos mono- y difluoroacetamido como nuevas sondas que facilitan el análisis por RMN de este tipo de interacciones. Así, en el año 2015,<sup>113</sup> su grupo de investigación demostró cómo, mediante el etiquetado de aminoazúcares con grupos difluoroacetamido, podían monitorizarse las interacciones carbohidrato-

---

<sup>112</sup> a) Bewley, C. A.; Shahzad-UI-Hussan, S. *Biopolymers* **2013**, 99, 796-806; b) Martínez, A.; Ortiz-Mellet, C.; García-Fernández, J. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4746-4773.

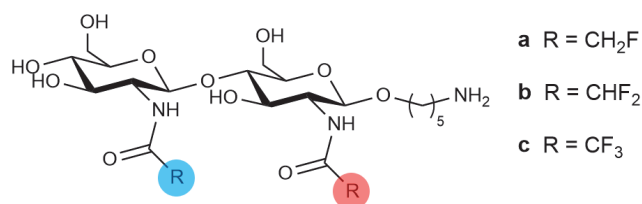
<sup>113</sup> Calle, L. P.; Echeverría, B.; Franconetti, A.; Serna, S.; Fernandez-Alonso, M. C.; Diercks, T.; Cañada, F. J.; Arda, A.; Reichardt, N. C.; Jimenez-Barbero, J. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 11408-11416.



proteína mediante una combinación de espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{19}\text{F}$ -RMN. Dos años después, en 2017,<sup>114</sup> emplearon también grupos monofluoroacetamido para marcar los aminoazúcares y, gracias a la alta sensibilidad de la sonda de flúor, desarrollaron una estrategia simple basada en espectroscopía de RMN para detectar las interacciones entre estos azúcares y ciertas lectinas en disolución. En concreto, se estudió la interacción entre derivados de la quitobiosa y una lectina modelo que reconoce *N*-acetilglucosamina, denominada aglutinina del germen de trigo (WGA). En la **Tabla 5.1** se recogen las medidas del ancho de las señales de  $^{19}\text{F}$ -RMN de derivados de quitobiosa marcados con grupos mono-, di- y trifluoroacetamida en presencia o ausencia de la lectina, y con diferentes relaciones proteína-ligando.

---

<sup>114</sup> Unione, L.; Alcalá, M.; Echeverría, B.; Serna, S.; Arda, A.; Franconetti, A.; Cañada, F. J.; Diercks, T.; Reichardt, N.; Jimenez-Barbero, J. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 3957-3965.



Relación Molar Proteína:Ligando	Ancho de la señal de <sup>19</sup> F (Hz)					
	a		b		c	
	-CH <sub>2</sub> F (rojo)	-CH <sub>2</sub> F (azul)	-CHF <sub>2</sub> (rojo)	-CHF <sub>2</sub> (azul)	-CF <sub>3</sub> (rojo)	-CF <sub>3</sub> (azul)
Ligando libre	8.0	8.0	6.9	6.2	6.4	6.4
1:10	32.7	34.2	22.0	31.4	9.7	12.0
1:17	20.2	26.5	18.3	23.4	8.0	10.3
1:33	13.5	15.3	11.7	16.9	7.7	8.4

**Tabla 5.1.** Medidas del ancho (en Hz) de las señales de <sup>19</sup>F correspondientes a los derivados de quitobiosa marcados con grupos mono-, di- y trifluoroacetamida, en presencia o ausencia de WGA, con diferentes relaciones de proteína-ligando. Imagen extraída de “*Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 3957-3965.”

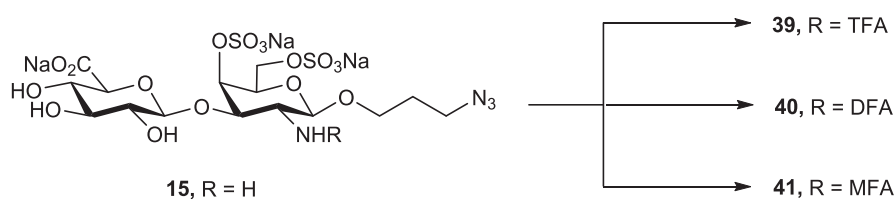
El aumento en el ancho de las señales de <sup>19</sup>F-RMN permitió monitorizar la interacción de los ligandos con la lectina y estimar su afinidad relativa.

Inspirados por estos estudios, se abordó en esta Tesis la preparación de sistemas multivalentes de CS-E marcados con flúor. Para ello, la estrategia más factible, desde el punto de vista sintético, implicaba la reacción entre

un derivado disacárido de CS-E con el grupo amino libre y el correspondiente agente acilante fluorado, tal y como se verá a continuación.

### 5.2.1.3. Síntesis del disacárido de repetición marcado con flúor

Se decidió llevar a cabo la síntesis de un nuevo ligando monovalente con flúor, que permitiera la obtención de sistemas multivalentes marcados, análogos a los dendrímeros de primera generación ya sintetizados en la presente Tesis. Los átomos de flúor se introducirían en la posición 2 que contiene el grupo amino en las unidades de galactosamina. Para ello, se partió del disacárido **15**, totalmente desprotegido y con el grupo amino libre, que se formó tras la hidrólisis básica del disacárido de CS-E **2**, ligando ya usado en esta Tesis Doctoral para la formación de nuestros sistemas multivalentes. (**Figura 3.11, Capítulo 3**) Se exploró la reacción del compuesto **15** con diversos agentes acilantes que contenían 1, 2 ó 3 átomos de flúor para obtener los correspondientes derivados marcados con grupos trifluoro- (NHTFA), difluoro- (NHDFA) o monofluoroacetamidos (NHMFA). (**Figura 5.9**) Para la formación del enlace amida se usaron diferentes condiciones de reacción que se recogen en la **Tabla 5.2**.



**Figura 5.9.** Esquema sintético para la obtención de ligandos monovalentes marcados con flúor.

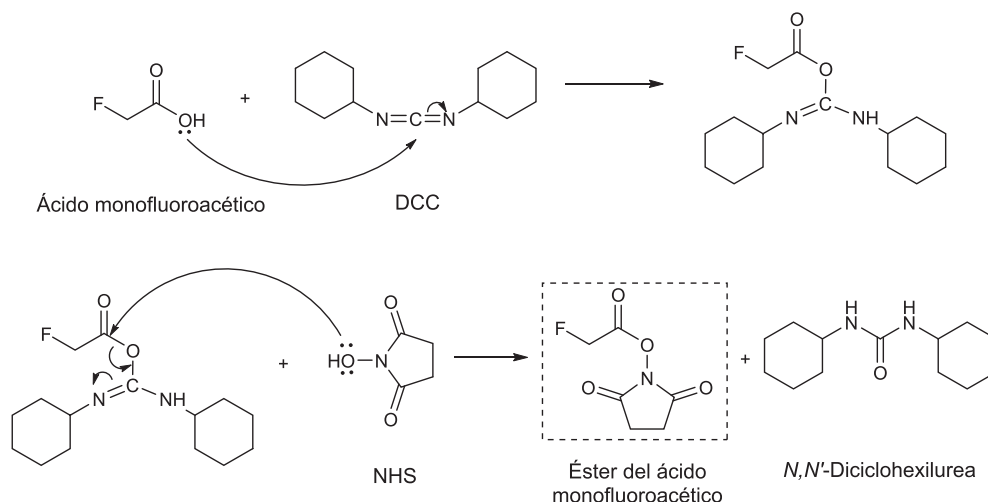
Ensayo	Disolvente	Agente acilante	Condiciones de reacción	Rendimiento
A	MeOH/H <sub>2</sub> O (4:1)	(CF <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O (20 eq)	TEA, 0°C → r.t., 5.5 h	-
B	MeOH/DMSO (4:1)	(CF <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O (20 eq)	TEA, 0°C → r.t., 5 h	-
C	MeOH	(CHF <sub>2</sub> CO) <sub>2</sub> O (20 eq)	TEA, 60°C, 4 h	-
D	Piridina	(CHF <sub>2</sub> CO) <sub>2</sub> O (3 eq)	0°C → r.t., 20 h	-
E	DMSO	(CHF <sub>2</sub> CO) <sub>2</sub> O (20 eq)	TEA, r.t., 4 h	-
F	MeOH/ Tampón NaHCO <sub>3</sub> (pH = 10.6)	(CHF <sub>2</sub> CO) <sub>2</sub> O (20 eq)	r.t., ON	-
G	MeOH/H <sub>2</sub> O (4:1) + NaOH 1M (pH = 10)	(CHF <sub>2</sub> CO) <sub>2</sub> O (20 eq)	r.t., ON	-
H	DMSO/DMF (1:1)	CH <sub>2</sub> FCOOH (15 eq)	DCC, NHS, r.t., ON	No determinado (producto impuro)
I	DMSO/DMF (1:1)	CH <sub>2</sub> FCOOH (15 eq)	1) DCC, NHS, r.t., ON 2) MeOH, MeONa, r.t., ON	29%

**Tabla 5.2.** Condiciones ensayadas para la reacción de marcaje con flúor del derivado monovalente **15**.

Como primera aproximación, se utilizaron las mismas condiciones que habían sido empleadas para la reacción de *N*-acetilación selectiva del intermedio **15** durante la síntesis del compuesto disacárido **1**. (**ensayo A, Tabla 5.2**) No se observó el producto *N*-trifluoroacetilado deseado **39**, obteniéndose únicamente el producto de partida **15**. A continuación, se realizó otro ensayo (**ensayo B, Tabla 5.2**), en el cual se sustituyó el H<sub>2</sub>O del disolvente por DMSO, con el objetivo de evitar la rápida reacción del anhídrido trifluoroacético con el agua y la consecuente descomposición del reactivo acilante. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados y se obtuvo de nuevo el disacárido de partida. En este punto conviene recordar que el tratamiento de la D-galactosamina con anhídrido trifluoroacético, en presencia de trietilamina y usando metanol como disolvente, permitió preparar el correspondiente derivado *N*-trifluoroacetilado con buen rendimiento, tal y como se describe en el Capítulo 1 de esta Tesis. Los problemas encontrados en la *N*-trifluoroacetilación de **15** pueden ser atribuidos a la presencia de cargas negativas (sulfatos y carboxilatos) en este disacárido de partida, que pueden formar un par iónico con el grupo amino en su forma protonada, dificultando su reacción con el anhídrido. A continuación, se decidió emplear un anhídrido menos reactivo que el trifluoroacético para limitar la posible hidrólisis del mismo en medios no anhidros. De esta forma, el compuesto **15** se trató con anhídrido difluoroacético, utilizando como disolvente MeOH y calentando la reacción a 60°C durante 4 horas, pero tampoco se detectó la formación del compuesto deseado **40**. (**ensayo C, Tabla 5.2**) También se decidió utilizar las condiciones de reacción que se habían empleado en la síntesis de derivados *N*-difluoroacetilados de quitobiosa en el grupo del profesor Jesús Jiménez Barbero.<sup>113</sup> Para ello, se disolvió el compuesto **15** en piridina, y se añadió el

anhídrido difluoroacético a 0°C, obteniéndose de nuevo el reactivo de partida exclusivamente. (**ensayo D, Tabla 5.2**) Para descartar que las trazas de agua presentes en el medio pudieran estar desactivando al anhídrido antes de reaccionar con el compuesto, el siguiente ensayo se llevó a cabo en condiciones totalmente anhidras, empleando tamiz molecular 4Å, activado previamente, y DMSO seco bajo atmósfera de argón, pero tampoco se observó ninguna mejora. (**ensayo E, Tabla 5.2**) Durante los ensayos anteriores se observaron cambios importantes en el pH del medio debido a la neutralización de las bases empleadas por el ácido formado, por lo que se decidió controlar los valores de pH en los ensayos posteriores. Para ello, se emplearon tanto una disolución tampón NaHCO<sub>3</sub> a pH = 10.6 como parte del disolvente (**ensayo F, Tabla 5.2**), como una disolución de NaOH 1M para el control del pH por encima de 10 (**ensayo G, Tabla 5.2**). En ambos ensayos, solo pudo aislarse el reactivo de partida **15**.

Finalmente, se optó por proteger el grupo amino con un grupo monofluoroacetilo, esperando que la reactividad fuera más similar a la encontrada en la acetilación que permitió obtener el compuesto **1** con buen rendimiento. Para ello, se utilizaron unas condiciones de reacción descritas en la bibliografía por Unione *et al.*<sup>114</sup> (**ensayo H, Tabla 5.2**) En primer lugar, se mezclaron disoluciones equimolares de ácido monofluoroacético (CH<sub>2</sub>FCOOH), *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) en DMF para formar el éster activado del ácido monofluoroacético. (**Figura 5.10**)



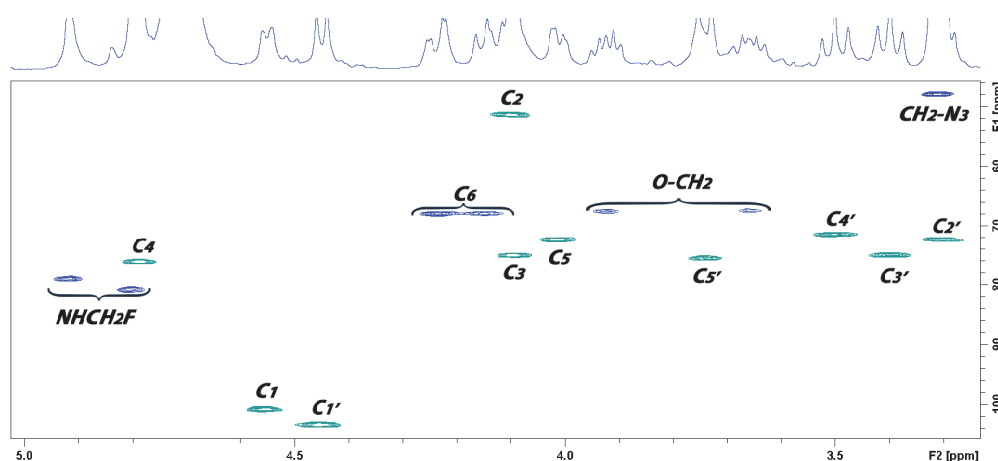
**Figura 5.10.** Mecanismo de formación del éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido monofluoroacético.

El éster de *N*-hidroxisuccinimida en DMF se añadió, bajo atmósfera inerte de argón, a un matraz que contenía el disacárido **15** disuelto en DMSO en presencia de tamiz activado (4Å). El análisis por  $^1\text{H}$ -RMN del producto obtenido permitió identificar, por primera vez, señales correspondientes al derivado fluorado deseado **41**.

Así, pudo observarse la variación de desplazamiento químico esperado para la señal del H-2 de galactosamina, que cambia desde un desplazamiento químico de 3.3 ppm, en el caso del compuesto con el grupo amino libre **15**, a otro de 4.1 ppm que corresponde al compuesto con el amino protegido **41**.

No obstante, el análisis del compuesto obtenido, tanto por RMN como por TLC, indicaba la presencia de diversos subproductos minoritarios cuya similitud en polaridad y tamaño con el disacárido **41** dificultaba la purificación del producto monofluoroacetilado. Estas impurezas se atribuyeron a la monofluoroacetilación parcial de alguno de los grupos

hidroxilo del disacárido de partida. Por ello, en el siguiente ensayo (**ensayo I, Tabla 5.2**), se decidió realizar una desprotección final en medio básico, empleando NaOMe en MeOH, para liberar aquellas funciones hidroxilo que hubieran sido monofluoroacetiladas. Tras llevar a cabo la purificación mediante cromatografía en gel de sílice, se obtuvo un compuesto puro que pudo ser caracterizado e identificado, mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, como el compuesto **41**. (**Figura 5.11**)



**Figura 5.11.** Espectro de RMN HSQC del compuesto **41**. En color azul se muestran los grupos  $\text{CH}_2$  y en color verde los grupos  $\text{CH}$  y  $\text{CH}_3$

A pesar de la dificultad encontrada en su síntesis, una vez obtenido y caracterizado el disacárido **41** marcado con flúor, se usó dicho ligando como unidad de repetición para la preparación de los dendrímeros de primera generación fluorados, como se describe a continuación.



#### 5.2.1.4. Síntesis de los dendrímeros de primera generación

##### marcados con flúor

Además de la obtención de los dendrímeros que presentan 3, 4 y 6 copias del ligando monofluorado **41**, se sintetizó el derivado monovalente **42**, que serviría como compuesto de referencia para la comparación de afinidades. (Figura 5.12)

Para la obtención del mencionado ligando monovalente se hizo reaccionar el disacárido **41** con propargilamina, formando el correspondiente anillo de triazol mediante química “click”. (Figura 5.12)

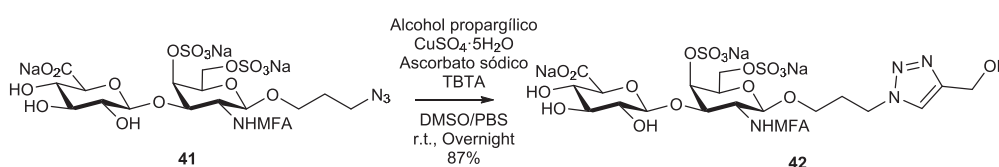
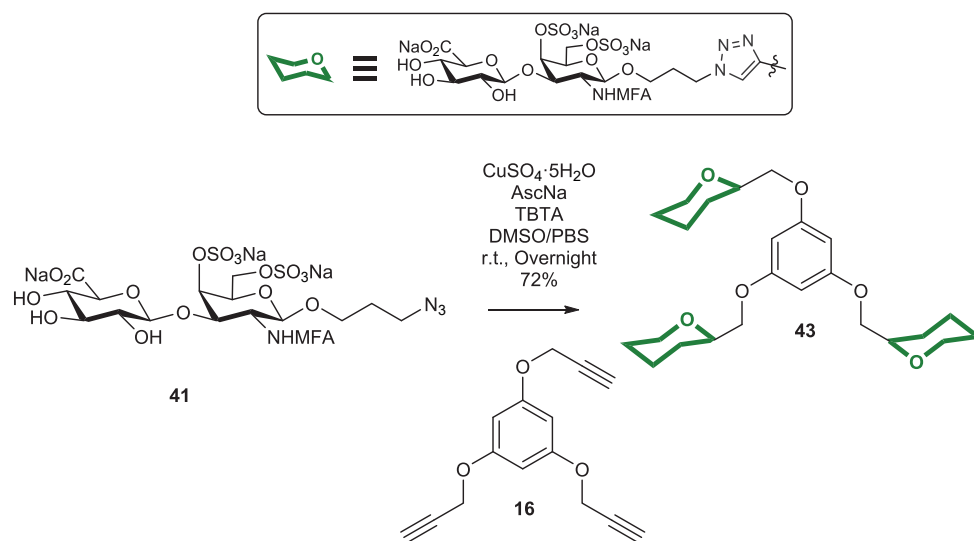


Figura 5.12. Síntesis del ligando monovalente **42**.

El disacárido **42** se trató con resina Quadrasil-MP para eliminar los posibles restos de cobre y se purificó mediante cromatografía de gel de exclusión por tamaño Sephadex LH-20. Finalmente, se obtuvo el compuesto **42** como sal sódica, tras el tratamiento con una resina de intercambio iónico DOWEX Na<sup>+</sup>, con un rendimiento del 87%.

Al confirmar que la reactividad del compuesto **41** no sufría grandes variaciones al compararlo con su homólogo **1**, se decidió emprender la síntesis de los dendrímeros, comenzando por el compuesto trivalente. Para ello, se hizo reaccionar el disacárido etiquetado con flúor **41** con el núcleo

**16**, empleando las condiciones de reacción que se muestran en la **Figura 5.13**.



**Figura 5.13.** Síntesis del dendrímtero trivalente **43**.

Tras la purificación característica descrita anteriormente para este tipo de compuestos, se obtuvo un producto que se identificó como la sal sódica del dendrímtero **43** con un rendimiento del 72%.

A continuación, se sintetizó el dendrímtero con 4 unidades de repetición, haciendo reaccionar el compuesto **41** con el núcleo tetravalente **17**. (**Figura 5.14**) Para ello se emplearon, al igual que antes, las condiciones optimizadas para la síntesis de dendrímteros en el Capítulo 3 de la presente Tesis. Tras purificación por cromatografía de exclusión molecular en gel Sephadex y tratamiento con una resina DOWEX  $\text{Na}^+$ , se obtuvo el compuesto **44** como sal sódica con un rendimiento del 48%.

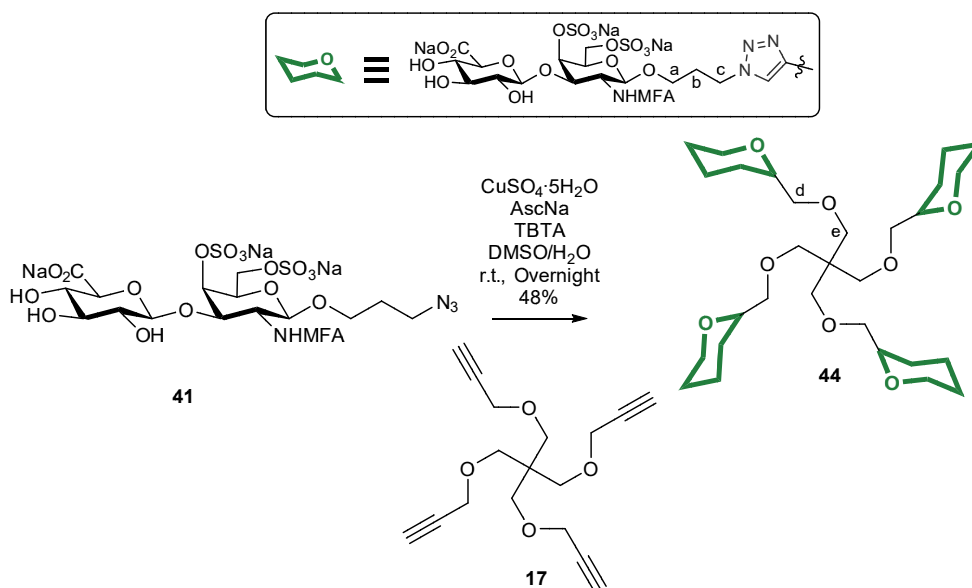


Figura 5.14. Síntesis del dendrímero tetravalente **44**.

El compuesto **44** fue caracterizado mediante espectrometría de masas y RMN. Así, en el experimento bidimensional de HSQC (Figura 5.15) pudieron asignarse todas las señales de la molécula objetivo.

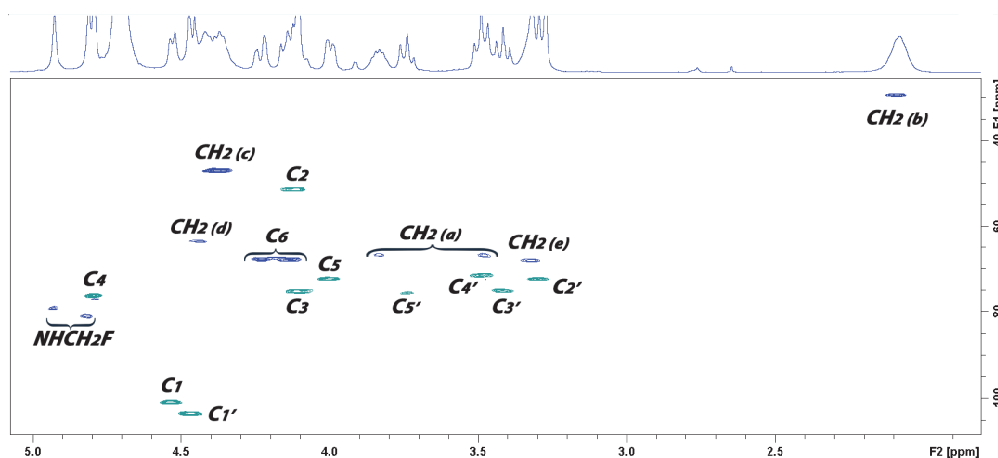


Figura 5.15. Asignación del espectro de HSQC del compuesto **44**. La asignación de los grupos CH<sub>2</sub> se indica en la Figura 5.14. En color azul se muestran los grupos CH<sub>2</sub> y en color verde los grupos CH y CH<sub>3</sub>

La síntesis del dendrímero hexavalente **45** se llevó a cabo, igualmente, mediante la reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I) entre el ligando **41** y el núcleo **18**, siguiendo los procedimientos optimizados y descritos anteriormente. (Figura 5.16)

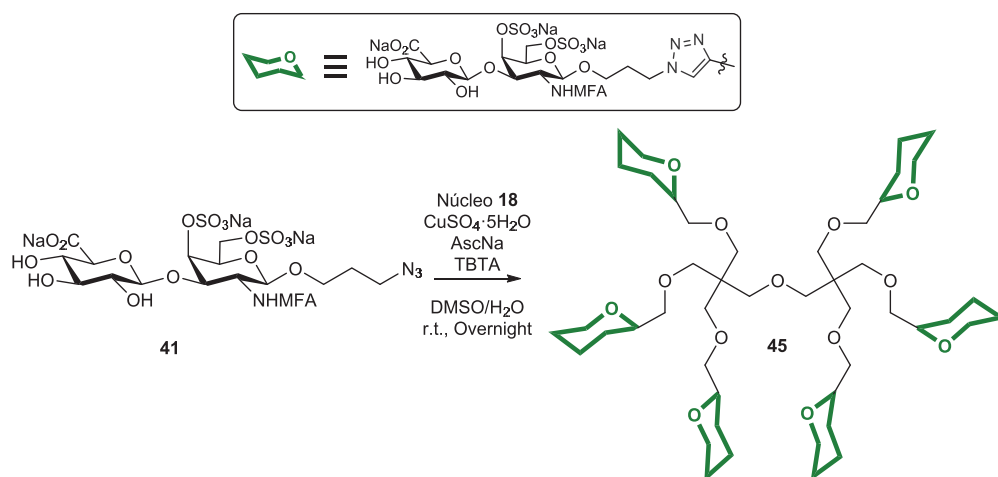
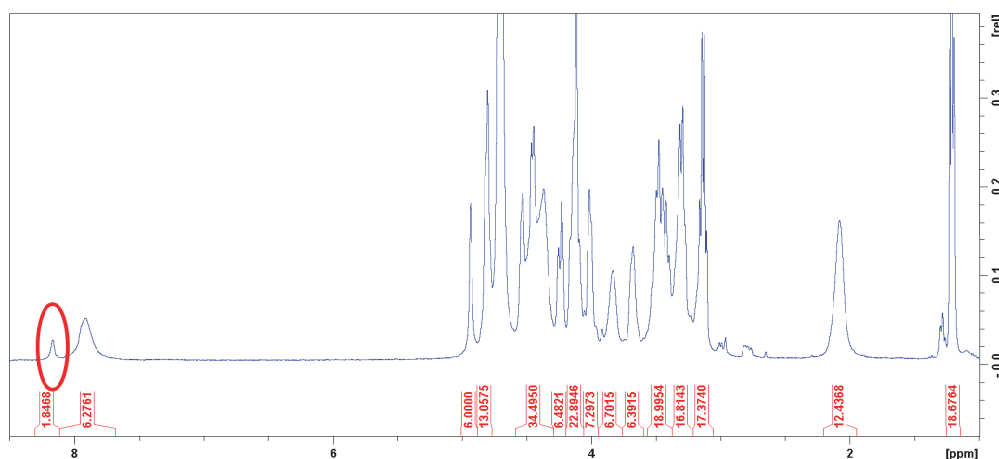


Figura 5.16. Síntesis del dendrímero hexavalente **45**.

No obstante, en este caso, el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 5.17) mostró una impureza que presentaba una señal adicional a 8.17 ppm, en la zona característica de los protones de los anillos de triazol, y cuya estructura no ha podido determinarse. Este subproducto no pudo eliminarse por técnicas cromatográficas, lo que impidió obtener una muestra pura del dendrímero hexavalente fluorado **45**.



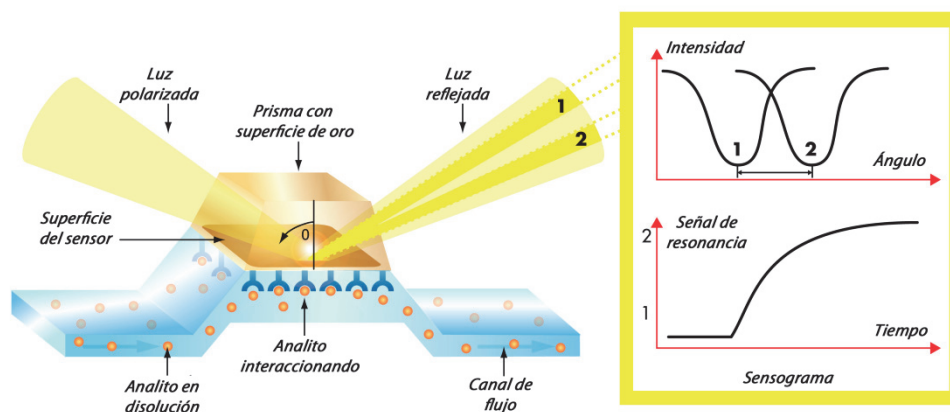
**Figura 5.17.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto obtenido en la síntesis del dendrímero hexavalente **45**. Se marca en rojo la señal a 8.17 ppm de la impureza.

La obtención de estos dendrímeros marcados con átomos de flúor, pese a no disponerse del ligando hexavalente puro, permitirá abordar en el futuro, en nuestro grupo de investigación, nuevos experimentos para estudiar las interacciones entre la Langerina y los miméticos de GAGs, aprovechando la sensibilidad que ofrece la espectroscopía de  $^{19}\text{F}$ -RMN.

### **5.2.2. Estudios de interacción dendrímero-Langerina mediante experimentos de Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR).**

Otra técnica que ha sido empleada de forma amplia en el campo de la investigación de las interacciones proteína-ligando es la resonancia del plasmón de superficie (SPR). Esta técnica tiene su fundamento en la óptica y permite medir cambios en el índice de refracción próximo a la superficie de un biosensor. (**Figura 5.18**) Durante la medida, un analito en disolución interacciona con los receptores que se encuentran inmovilizados en la

superficie de un chip de oro. Al cambiar la naturaleza de dicha superficie, se produce un cambio en el índice de refracción cercano al chip, que permite medir la desviación de la luz reflejada y, por lo tanto, monitorizar la interacción entre el analito y los receptores en tiempo real.



**Figura 5.18.** Esquema del biosensor con detección por SPR.

De estas medidas se obtienen una serie de curvas denominadas sensogramas (**Figura 5.19**), a partir de los cuales pueden obtenerse los parámetros cinéticos y termodinámicos de la interacción. Las dos principales ventajas de esta técnica de estudio consisten, en primer lugar, en no necesitar el empleo de ligandos ni proteínas marcados y, en segundo lugar, la baja cantidad de muestra, tanto de ligando como de proteína, necesaria para llevar a cabo el ensayo.<sup>115</sup>

<sup>115</sup> a) McDonnell, J. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 572-577; b) Homola, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 528-539; c) Homola, J. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 462-493; d) Rich, R. L.; Myszka, D. G. *Curr. Opin. Biotech.* **2000**, 11, 54-61.

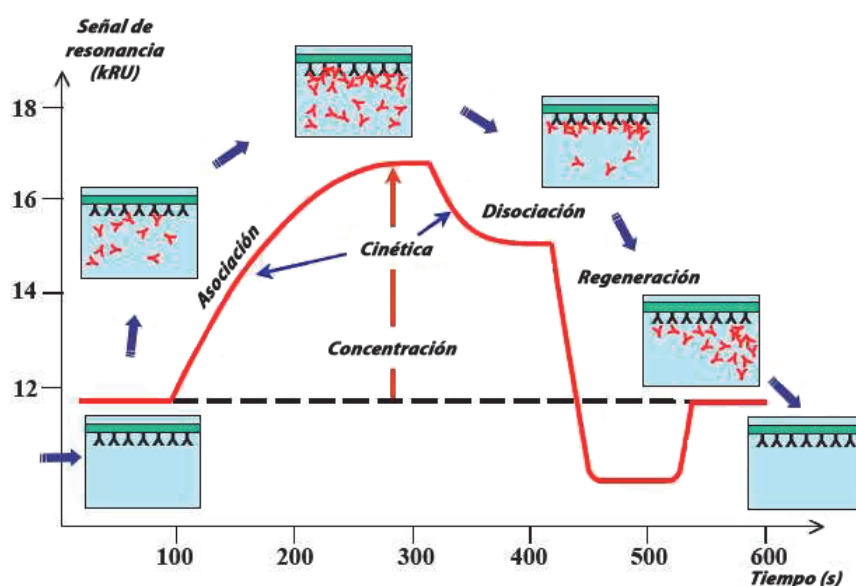


Figura 5.19. Representación esquemática de un sensograma de SPR.

En la representación esquemática del sensograma se pueden diferenciar 4 etapas. En la primera etapa, únicamente se pasa disolución tampón y por lo tanto se observa una línea base. Durante la segunda etapa se introduce el analito en disolución de forma que la señal aumenta a medida que se genera una interacción con los receptores inmovilizados; dicha etapa se denomina fase de asociación. A continuación, se deja de pasar analito y se sigue pasando disolución tampón de forma que el analito que ha interactuado se va liberando, poco a poco, en la llamada fase de disociación. Para finalizar, se inyecta una disolución que sirve para regenerar la superficie, eliminando toda interacción entre los receptores y el analito asociado; esta fase se denomina regeneración.

A la hora de plantear el experimento, hay que establecer si el analito en disolución será la proteína o el ligando con el que se quiere estudiar la interacción. Habitualmente, los estudios de interacción carbohidrato-

proteína se realizan inmovilizando el ligando en la superficie del biosensor y haciendo pasar la proteína en disolución. De esta manera, se simula la presentación de los azúcares en la membrana celular.<sup>116</sup> No obstante, puede aplicarse el método inverso, inmovilizando la proteína en la superficie. Existen autores que sostienen que las constantes cinéticas y de afinidad obtenidas durante el experimento son similares mediante ambas aproximaciones.<sup>117</sup>

La técnica de SPR ya ha sido empleada en nuestro grupo de investigación con anterioridad. Por ejemplo, gracias a ella, se demostró que la funcionalización superficial con 32 manosas de un dendrímero comercial de tercera generación permitía la interacción con la proteína DC-SIGN en el rango bajo micromolar.<sup>118</sup> Además, existen referencias sobre estudios de interacción entre oligosacáridos de tipo GAG y la Langerina mediante dicha técnica.<sup>109,119</sup>

Con el objetivo de complementar los resultados obtenidos mediante RMN, se decidió emplear la técnica del SPR para el estudio de la interacción de los glicodendrímeros sintetizados en la presente Tesis con la Langerina, en colaboración con el grupo del profesor Franck Fieschi del Instituto de Biología Estructural (CNRS, Grenoble, Francia), que cuenta con experiencia previa en este tipo de sistemas.<sup>118</sup> A continuación, se describirán los resultados preliminares de los experimentos llevados a cabo en Grenoble. Hasta el momento, se han realizado dos tipos de ensayo: a) experimentos de

---

<sup>116</sup> Duverger, E.; Frison, N.; Roche, A. C.; Monsigny, M. *Biochimie* **2003**, *85*, 167-169.

<sup>117</sup> Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Kake, H.; Shibuya, N. *Glycobiology* **1997**, *7*, 1201-1208.

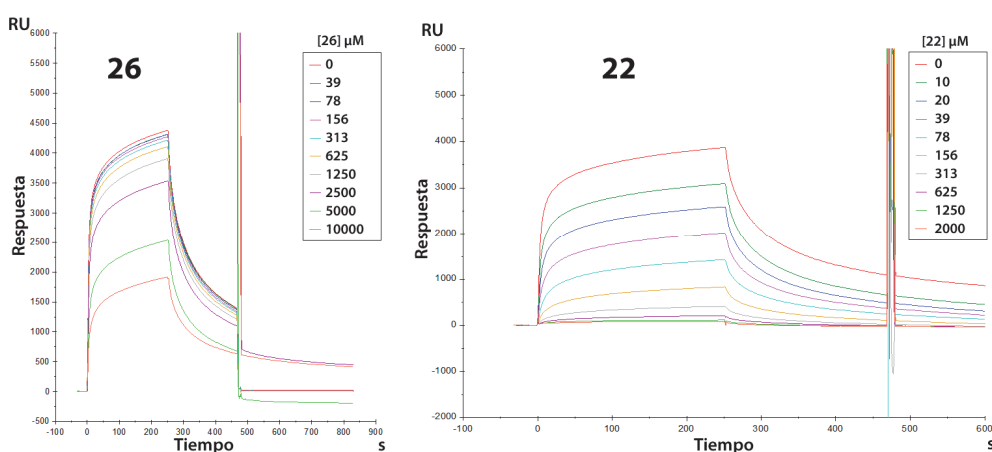
<sup>118</sup> Tabarani, G.; Reina, J. J.; Ebel, C.; Vivés, C.; Lortat-Jacob, H.; Rojo, J.; Fieschi, F. *FEBS Letters* **2006**, *580*, 2402-2408.

<sup>119</sup> Zhao, J.; Liu, X.; Kao, C.; Zhang, E.; Li, Q.; Zhang, F.; Linhardt, R. J. *Biochemistry* **2016**, *55*, 4552-4559.



competición por la Langerina entre nuestros derivados y la proteína BSA manosilada y b) experimentos de interacción directa entre los ligandos de CS-E y la lectina Langerina.

Para los ensayos de competición, se inmovilizó en primer lugar la proteína BSA-manosilada sobre la superficie del chip mediante acoplamiento entre los grupos carboxilato presentes en la superficie de la lámina de oro y los grupos amino de la proteína (pertenecientes a los aminoácidos arginina y lisina). A continuación, se inyectaron sobre dicha superficie mezclas que contenían Langerina y concentraciones crecientes de los distintos ligandos de CS-E como analitos en disolución. En la **Figura 5.20** se muestran los sensogramas obtenidos con el ligando monovalente **26** y el dendrímero trivalente **22**.



**Figura 5.20.** Sensogramas de los experimentos de competición por SPR para los compuestos **26** y **22** a distintas concentraciones.

En ausencia de ligando, cuando únicamente se pasa Langerina como analito en disolución, se observa una señal máxima, debida a la unión de la lectina con el receptor BSA-manosa de la superficie del chip. Conforme van

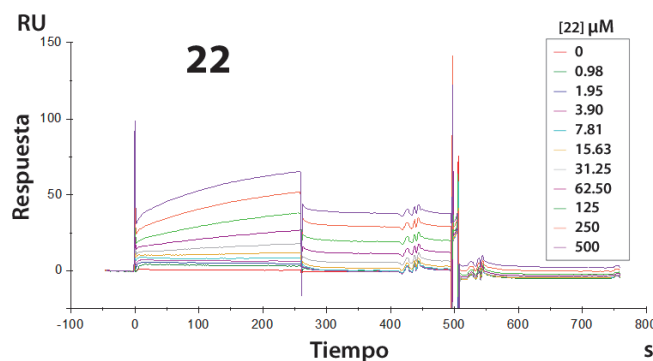
aumentándose las concentraciones de los respectivos ligandos de CS-E se aprecia una disminución de la respuesta, debido a la interacción entre la Langerina y los compuestos derivados de CS-E **22/26**. Las curvas de competición que generan dichos sensogramas permitieron calcular los valores de  $IC_{50}$  para la interacción de nuestros derivados **22** y **26** con la Langerina. (**Tabla 5.3**)

Compuesto	26	22
$IC_{50}(\mu M)$	6600	50
RIP	1	44

**Tabla 5.3.** Tabla de valores de  $IC_{50}$  y RIP del ligando monovalente **26** y del ligando trivalente **22**.

Tal y como puede observarse en la tabla anterior, el valor de  $IC_{50}$  para el ligando monovalente **26** fue de 6.6 mM, y de 50  $\mu M$  para el dendrímero trivalente **22**. Estos datos indican que la afinidad del dendrímero es muy superior a la del disacárido monovalente, lo que confirma la utilidad de estos sistemas como miméticos del CS-E, con alta afinidad por la lectina Langerina. Además, el cálculo de la potencia inhibitoria relativa (RIP) del ligando trivalente **22**, empleando como referencia el valor de  $IC_{50}$  del ligando monovalente **26**, da como resultado un valor de RIP de 44, que confirma claramente un efecto multivalente.

Por otra parte, también se realizó un ensayo de interacción directa entre el dendrímero trivalente **22** y la Langerina. Para ello, se inmovilizó la lectina a la superficie del chip de oro y se utilizó como analito en disolución el compuesto **22**. El sensograma obtenido se muestra en la **Figura 5.21**.



**Figura 5.21.** Sensograma del experimento de interacción directa por SPR para la Langerina y el compuesto **22** a distintas concentraciones.

El análisis de los resultados obtenidos en la medida directa ligando-proteína permitió calcular un valor de  $K_D$ , que en este caso es igual a 164  $\mu\text{M}$ . Este valor es del mismo orden de magnitud que el  $\text{IC}_{50}$  obtenido en el experimento de competición anterior para la unión de **22** con la Langerina.

Por lo tanto, los experimentos preliminares de SPR que se han llevado a cabo en Grenoble, muestran una interacción entre los compuestos sintetizados **22** y **26**, y la lectina Langerina. En el caso del dendrímero trivalente, se observa una afinidad mucho mayor que la del ligando monovalente, lo que puede atribuirse al efecto multivalente y también, al anillo aromático, como indicaban los experimentos de RMN. Estos ensayos fueron llevados a cabo en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  por lo que no podemos esclarecer aún si la interacción mostrada con la lectina es debida a la unión en la zona dependiente o independiente de calcio. Está previsto continuar dichos estudios mediante SPR con el resto de dendrímeros de primera y segunda generación descritos en los capítulos 3 y 4 de la presente Tesis Doctoral, para profundizar en el conocimiento de la interacción entre los miméticos dendriméricos de CS-E y la lectina Langerina.



## CAPÍTULO 6.

## CONCLUSIONES.



## 6. Conclusiones

1. En la presente Tesis Doctoral, se ha desarrollado una estrategia sintética eficiente para la preparación de dendrímeros que presentan ligandos disacáridicos de CS-E como miméticos del producto natural. Para ello, se ha puesto a punto la reacción de cicloadición 1,3 dipolar, catalizada por Cu (I), entre disacáridos desprotegidos de CS-E con un grupo azido en su terminal reductor y núcleos dendríticos que poseen grupos alquino en su estructura. De esta manera, se han sintetizado con un alto rendimiento, dendrímeros de valencia 3, 4 y 6, como sistemas multivalentes monodispersos con estructura química bien definida.
2. Experimentos de competición de FP han demostrado la interacción entre los dendrímeros sintetizados de valencia 3, 4 y 6 y la Midkina, una proteína implicada en el crecimiento y proliferación celular. Nuestros resultados indican que la afinidad relativa de esta interacción está en el rango bajo micromolar, con valores muy superiores a los mostrados por el ligando disacárido monovalente. La mayor afinidad mostrada por los dendrímeros confirma que la disposición multivalente del disacárido en su estructura aumenta su capacidad de interaccionar con la Midkina, debido al efecto multivalente.
3. La síntesis de un dendrón trivalente de CS-E que posee un grupo azida en su posición focal ha permitido la preparación de un dendrón marcado fluorescentemente, mediante reacción de cicloadición 1,3 dipolar, con un derivado de fluoresceína funcionalizado con un grupo alquino. Además, dicho dendrón trivalente se ha utilizado para la obtención, usando una ruta sintética convergente y con alto rendimiento, de dendrímeros de CS-E de 2ª generación, que presentan en su estructura 9, 12 y 18 copias del

disacárido. Estos complejos sistemas multivalentes poseen pesos moleculares entre 7.5 y 15 KDa, próximos a los de los polisacáridos naturales. Para la caracterización de estos dendrímeros de 2ª generación ha resultado clave el uso de la espectroscopía de masas MALDI-ToF, mediante la detección de los complejos formados entre los dendrímeros y proteínas o péptidos básicos.

4. La interacción entre la Langerina, una lectina tipo C implicada en el sistema inmunológico, y algunos de los dendrímeros sintetizados se ha demostrado mediante RMN. Experimentos de STD revelan 2 modos de unión diferentes para el disacárido monovalente y los dendrímeros. Mientras que el disacárido interacciona en el sitio dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los OH 2, 3 y 4 de su terminal no reductor, los sistemas multivalentes se unen al sitio independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de la Langerina. En este contexto, se ha desarrollado una estrategia sintética para la obtención de dendrímeros que poseen grupos monofluoroacetamido en su estructura, lo que permitirá el uso de  $^{19}\text{F}$ -RMN para la observación y monitorización de las interacciones. Por último, experimentos preliminares de SPR también confirman la interacción, en el rango micromolar, del dendrímero trivalente **22** con la Langerina y el aumento de la afinidad, en comparación con el ligando disacárido, debido al efecto multivalente.



## CAPÍTULO 7.

### **PARTE EXPERIMENTAL.**



## 7.1. Disolventes y reactivos

Los reactivos y productos de partida empleados en la presente Tesis fueron obtenidos de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Dextra, Fluka, Carbosynth, Lumiprobe y TCI. Todos ellos fueron empleados sin purificación previa.

Los disolventes utilizados fueron obtenidos de las casas comerciales Scharlab, VWR, Carlo Erba y Merck. El agua empleada como disolvente muestra una pureza miliQ (18.3  $\Omega$ ). Los disolventes anhidros empleados fueron obtenidos mediante tratamiento con tamiz molecular activado (4Å). Para las reacciones en las que se ha precisado atmósfera inerte, se empleó argón.

## 7.2. Técnicas y aparatos

Para el seguimiento de las reacciones se utilizó cromatografía en placa fina, empleando cromatofolios de aluminio de gel de sílice 600 F<sub>254</sub> (Merck). Para la detección de los productos se empleó luz UV ( $\lambda$  = 254 y 356 nm). Como reveladores para las cromatografías en placa fina se emplearon H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:EtOH (1:9 v/v), anisaldehído (EtOH:Anisaldehído:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:AcOH 450:25:25:1 v/v), mostain (25 g Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 5 g Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 50 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado en 450 mL H<sub>2</sub>O) y permanganato (1.5 g KMnO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.25 mL NaOH 10% en 200 mL de agua), en función de las características de los compuestos. Para las purificaciones, se emplearon columnas cromatográficas de gel de sílice con 2 tamaños de partícula diferentes (0.2-0.063 mm y 0.040-0.015 mm). También se utilizaron columnas de exclusión de tamaño, empleando gel de Sephadex LH-20. La composición de los

eluyentes empleados se describe en cada uno de los casos. La ultracentrifugación de los dendrímeros de 2ª generación se llevó a cabo mediante el empleo de filtros Amicon® Ultra 4, de 3 y 10 kDa. Para las cromatografías de intercambio iónico se utilizó la resina DOWEX 50WX2 Na<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich).

Para la caracterización de los compuestos sintetizados, los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron registrados en los espectrómetros Bruker DRX-500, DRX-400, AvanceIII-400/R y DPX-300. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm. Los espectros se realizaron empleando los disolventes deuterados indicados en cada caso. Se empleó como referencia interna la señal residual de cada disolvente. Para la asignación de los compuestos más complejos se llevaron a cabo experimentos bidimensionales de correlación protón-protón (COSY) o protón-carbono (HSQC) usando secuencias de pulso estándar. Los espectros fueron registrados a 25°C. La multiplicidad de las señales se indican mediante el empleo de las siguientes abreviaturas: s (singlete), bs (singlete ancho), d (doblete), dd (doble doblete), t (triplete), q (cuartete) y m (multiplete).

Para la obtención de los espectros de masas de los dendrímeros de segunda generación se empleó un espectrómetro MALDI-ToF Bruker modelo "Microflex LRF" (con fuente MALDI sin rejilla, sistema de extracción pulsada de iones PIE, laser de nitrógeno de 60Hz a 337nm, con deflexión de matriz, modo lineal y con reflector del analizador de tiempo de vuelo ToF). Para el resto de compuestos, los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por electrospray con un equipo Bruker Esquire 6000. Los espectros de masas de alta resolución (HR MS) se realizaron en el Centro de

Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS) de la Universidad de Sevilla, mediante ionización por electrospray, empleando un equipo QExactive. Para los compuestos con múltiples cargas, solo se facilita la señal de mayor intensidad, ya que aparecen señales con múltiples cargas y gran diversidad de contraiones. Para aquellas reacciones que han precisado el empleo de un reactor de microondas, se utilizó un equipo Biotage® Initiator EXP US.

Los datos de polarización de fluorescencia se registraron empleando un lector de microplacas multimodo TRIAD (Dynex), y utilizando filtros de polarización con longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 535 nm, respectivamente. Estos experimentos se llevaron a cabo en microplacas de 384 pocillos (Corning). La sonda fluorescente (hexasacárido de heparina) se disolvió en una solución salina tamponada de fosfato (PBS, 10 mM, pH 7.4). El factor de crecimiento utilizado en el estudio fue Midkina humana recombinante (Peprotech), que se disolvió en tampón fosfato (PBS, 10 mM, pH 7.4), que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA).

Para el ensayo de interacción directa entre la sonda fluorescente y la Midkina, se transfirió a los pocillos de una microplaca, una disolución de sonda fluorescente 20 nM (15  $\mu$ L) y una serie de disoluciones de Midkina (15  $\mu$ L), con concentraciones que iban desde 24 nM hasta 1.5  $\mu$ M, obteniéndose finalmente un volumen de muestra en cada pocillo de 30  $\mu$ L. Todas las medidas se realizaron por triplicado. La microplaca se agitó en la oscuridad durante 5 minutos antes de introducirse en el lector de fluorescencia. Se preparó también una muestra blanco que contenía una disolución de Midkina (1.5  $\mu$ M, 15  $\mu$ L) y PBS (15  $\mu$ L), y cuya lectura de fluorescencia fue restada a todos los demás valores. Adicionalmente, los pocillos en los que se transfirió la disolución de la sonda fluorescente (20 nM, 15  $\mu$ L) y PBS con un

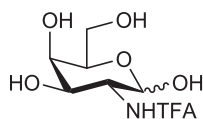
1% de BSA (15  $\mu$ L) proporcionaron los valores de la polarización residual de la disolución de la sonda fluorescente en ausencia de proteína.

Para los experimentos de competición que proporcionaron los valores de  $IC_{50}$ , se midió la polarización de fluorescencia de los pocillos que contenían 20  $\mu$ L de una disolución 125 nM de Midkina y 10  $\mu$ L de una disolución 40 nM de la sonda fluorescente, en presencia de 10  $\mu$ L de disolución del inhibidor a distintas concentraciones. De esta forma, el volumen total de muestra en cada pocillo fue de 40  $\mu$ L, siendo la composición final del buffer PBS + 0.5% BSA.

### **7.3. Procedimientos sintéticos y caracterización estructural de los compuestos preparados**

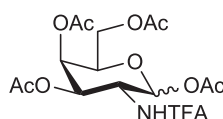
En este apartado se presentan aquellos compuestos que no han sido previamente descritos, o cuyas síntesis han sido mejoradas a lo largo de la presente tesis. El resto de compuestos, **16**,<sup>81</sup> **17**,<sup>81</sup> **18**,<sup>81</sup> **27**<sup>81</sup> y **28**,<sup>92</sup> han sido obtenidos siguiendo los procedimientos recogidos en la bibliografía.

**2-Deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (5):**<sup>73</sup>



D-galactosamine hydrochloride (8.0 g, 37.1 mmol) was suspended in MeOH (100 mL), and triethylamine (5.5 mL) was added. After stirring at room temperature for 30 minutes, trifluoroacetic anhydride (5.2 mL, 37.5 mmol) and more triethylamine (5.5 mL) were added at 0°C. After stirring for 24 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated to dryness. The residue was directly used in the next step without further purification. TLC (4:4:1 MeOH–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–NH<sub>4</sub>OH) R<sub>f</sub> 0.66.

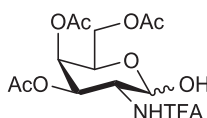
**1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (6):**<sup>73</sup>



Compound **5** and DMAP (2.43 g, 19.9 mmol) were dissolved in Py (50 mL). Acetic anhydride (37 mL, 423 mmol) was added slowly at 0°C. After stirring at room temperature for 72 h, the reaction mixture was diluted with EtOAc (500 mL) and washed with 1 M HCl aqueous solution, saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and H<sub>2</sub>O. The organic layer was dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane–EtOAc 2:1) to afford **6** (12 g, 73%). TLC (2:1 hexane–EtOAc) R<sub>f</sub> 0.27; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (data for  $\alpha$  anomer):

$\delta$  6.55 (bs, 1H, NH), 6.28 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz, H-1), 5.46 (m, 1H, H-4), 5.29 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 11.4$  Hz,  $J_{3,4} = 3.5$  Hz, H-3), 4.68 (m, 1H, H-2), 4.28–4.03 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.18–2.00 (m, 12H, CH<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (data for  $\beta$  anomer):  $\delta$  7.02 (bs, 1H, NH), 5.77 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.7$  Hz, H-1), 5.40 (m, 1H, H-4), 5.18 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 11.3$  Hz,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz, H-3), 4.49 (m, 1H, H-2), 4.28–4.03 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.18–2.00 (m, 12H, OAc); ESI MS:  $m/z$  calcd for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>10</sub>: 443.1; found: 466.1 [M + Na]<sup>+</sup>

**3,4,6-Tri-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (7):**<sup>70a</sup>

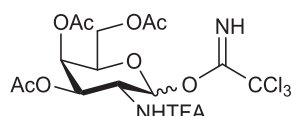


Compound **6** (2.76 g, 6.23 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) and hydrazine monohydrate (25 mL of a 0.5 M solution in Py/AcOH 3:2) was added. After stirring at room temperature for 1h, the reaction mixture was quenched with acetone (2 mL). The mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with 1 M HCl aqueous solution, saturated NaHCO<sub>3</sub> aqueous solution and H<sub>2</sub>O. The organic layer was dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-EtOAc 2:1) to afford **7** (1.82 g, 73%). TLC (hexane-EtOAc 3:2) R<sub>f</sub> 0.31; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (data for  $\alpha$  anomer):  $\delta$  6.68 (d, 1H,  $J_{\text{NH},2} = 9.5$  Hz, NH), 5.46 (d, 1H,  $J_{3,4} = 3.0$  Hz, H-4), 5.42 (d, 1H,  $J_{1,2} = 4.0$  Hz, H-1), 5.34 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 11.3$  Hz,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz, H-3), 4.60 (m, 1H, H-2), 4.48 (t, 1H,  $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.3$  Hz, H-5), 4.17 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.21, 2.09, 2.03 (3s,



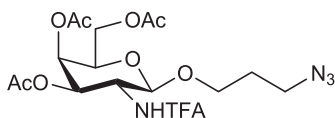
9H, OAc);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.1, 171.0, 170.4 (3 x CO), 157.6 (q,  $J_{\text{C,F}} = 37.8$  Hz,  $\text{COCF}_3$ ), 115.6 (q,  $J_{\text{C,F}} = 288.3$  Hz,  $\text{COCF}_3$ ), 91.4 (C-1), 67.8 (C-3), 67.3 (C-4), 66.6 (C-5), 62.1 (C-6), 48.7 (C-2), 20.7, 20.6, 20.4 (3 x OAc); HR-MS:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NNaO}_9$   $[M+\text{Na}]^+$ : 424.0826; found: 424.0826

**O-(3,4,6-tri-O-Acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranosyl) trichloroacetimidate (**8**):<sup>70a</sup>**



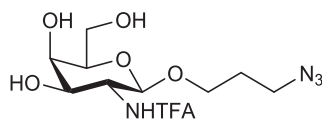
Trichloroacetonitrile (7.8 mL, 78 mmol) and catalytic DBU (78  $\mu\text{L}$ , 0.52 mmol) were added to a solution of **7** (2.08 g, 5.2 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL). After stirring for 4 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated to dryness. The residue was purified by a short silica gel column chromatography (hexane-EtOAc 3:1 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) to afford **8** (2.04 g, 78%). TLC (hexane-EtOAc 2:1 + 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ )  $R_f$  0.43;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (data for  $\alpha$  anomer):  $\delta$  8.85 (s, 1H, NH), 6.59 (d, 1H,  $J_{\text{NH},2} = 9.0$  Hz, NH(TFA)), 6.47 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz, H-1), 5.53 (m, 1H, H-4), 5.35 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 3.2$  Hz,  $J_{2,3} = 11.2$  Hz, H-3), 4.77 (m, 1H, H-2), 4.38 (m, 1H, H-5), 4.14 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.20, 2.04, 2.03 (3s, 9H, OAc);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.1, 170.3, 170.1 (3 x CO), 160.1 (C=NH), 157.5 (q,  $J_{\text{C,F}} = 37.8$  Hz,  $\text{COCF}_3$ ), 115.5 (q,  $J_{\text{C,F}} = 288.3$  Hz,  $\text{COCF}_3$ ), 94.3 (C-1), 90.6 ( $\text{CCl}_3$ ), 69.2 (C-5), 67.7 (C-3), 66.3 (C-4), 61.1 (C-6), 48.2 (C-2), 20.6, 20.6, 20.4 (3 x OAc); ESI MS:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{Cl}_3\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_9$ : 544.0; found: 569.1  $[M+\text{Na}]^+$ .

**3-Azidopropyl 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside (9):**



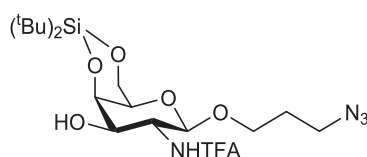
Donor **8** (815 mg, 1.49 mmol) was coevaporated with toluene, dried under vacuum and then dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL) in the presence of freshly activated 4Å molecular sieves. 3-Azidopropanol (207  $\mu\text{L}$ , 2.24 mmol) was added and the mixture was stirred for 10 min. TMSOTf (54  $\mu\text{L}$ , 0.30 mmol) was added at 0°C. After stirring for 15 min at 0°C, the reaction mixture was neutralized with  $\text{Et}_3\text{N}$ , filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-EtOAc 2:1) to afford **9** (585 mg, 81%). TLC (hexane-EtOAc 2:1)  $R_f$  0.23;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.91 (d, 1H,  $J_{\text{NH},2} = 8.1$  Hz, NH), 5.37 (d, 1H,  $J_{3,4} = 3.0$  Hz, H-4), 5.22 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 11.4$  Hz,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz, H-3), 4.62 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.4$  Hz, H-1), 4.23-3.93 (m, 5H, H-2, H-5, H-6a, H-6b, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$ ), 3.57 (m, 1H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$ ), 3.35 (m, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$ ), 2.16, 2.05, 1.99 (3s, 9H, OAc), 1.84 (m, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.8, 170.6, 170.3 (3 x CO), 157.5 (q,  $J_{\text{C},\text{F}} = 37.8$  Hz,  $\text{COCF}_3$ ), 115.6 (q,  $J_{\text{C},\text{F}} = 288.3$  Hz,  $\text{COCF}_3$ ), 100.7 (C-1), 70.9 (C-5), 69.6 (C-3), 66.6, 66.5 (C-4, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$ ), 61.5 (C-6), 51.6 (C-2), 47.9 (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$ ), 28.9 (O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}_3$ ), 20.7, 20.6, 20.4 (3 x OAc); HR-MS:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_4\text{NaO}_9$   $[M+\text{Na}]^+$ : 507.1309; found: 507.1312

### 3-Azidopropyl 2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside (**10**)



Compound **9** (325 mg, 0.67 mmol) was dissolved in MeOH (3 mL), and NaOMe (47  $\mu$ L of a 2.17 M solution in MeOH) was added. After 45 min, Amberlite acidic resin was added until pH 7. The Amberlite resin was filtered off, and the solvent was removed under vacuum to give **10** (231 mg, 96%) that was directly used in the next step without further purification. TLC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 8:1) Rf 0.36.

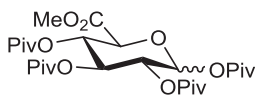
### 3-Azidopropyl 4,6-O-di-*tert*-butylsilylene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside (**4**):



Compound **10** (333 mg, 0.93 mmol) was dissolved in dry Py (17 mL) and cooled (0°C). Di-*tert*-butylsilyl bis(trifluoromethanesulfonate) (0.33 mL, 1.0 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 15 min. The reaction was quenched with MeOH (1.5 mL), diluted with EtOAc (100 mL), and washed with 1 M HCl, saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$ , and  $\text{H}_2\text{O}$ . The organic phase was dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-EtOAc 3:1) to afford **4** as a white foam (435 mg, 94%). TLC (toluene- EtOAc

6:1) R<sub>f</sub> 0.18; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.85 (d, 1H, J<sub>NH,2</sub> = 8.5 Hz, NH), 4.53 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> = 8.1 Hz, H-1), 4.38 (d, 1H, J<sub>3,4</sub> = 3.0 Hz, H-4), 4.26 (m, 2H, H-6), 3.97-3.88 (m, 2H, H-2, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.76 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> = 10.5 Hz, J<sub>3,4</sub> = 2.8 Hz, H-3), 3.54 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.44 (bs, 1H, H-5), 3.33 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.80 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.05, 1.04 (s, 18H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 158.0 (q, J<sub>C,F</sub> = 37.6 Hz, COCF<sub>3</sub>), 115.8 (q, J<sub>C,F</sub> = 287.3 Hz, COCF<sub>3</sub>), 100.0 (C-1), 72.0 (C-4), 71.3 (C-5), 71.0 (C-3), 66.8 (C-6), 65.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 54.6 (C-2), 48.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 27.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.3, 20.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); HR-MS: *m/z* calcd for C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>6</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup>: 521.2014; found: 521.2019

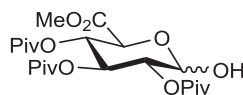
**Methyl 1,2,3,4- tetra-O-pivaloyl- α,β-D-glucopyranosuronate (11):**<sup>78</sup>



D-glucuronolactone (7.0 g, 39.7 mmol) was dissolved in 45 mL of a 0.01 M solution of NaOH in MeOH. After stirring at room temperature for 1 hour, the reaction mixture was concentrated under vacuum and dissolved in Py (60 mL). Pivaloyl chloride (25 mL, 200 mmol) and DMAP (979 mg, 8 mmol) were added slowly at 0°C and the mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was then diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 mL), and washed with 1 M HCl, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, and H<sub>2</sub>O. The organic phase was dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-EtOAc 9:1) to afford **11** as a white foam (15.09 g, 70%). TLC (hexane - EtOAc 9:1) R<sub>f</sub> 0.31.

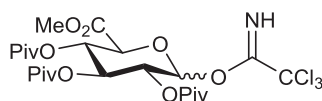
Spectroscopic data were in agreement with those reported in the literature.<sup>78b</sup>

**Methyl 2,3,4- tri-O-pivaloyl-  $\alpha,\beta$ -D-glucopyranosuronate (12):**<sup>78</sup>



Compound **11** (1.54 g, 2.82 mmol) was dissolved in DMF (15 mL). After cooling at  $-10^{\circ}\text{C}$ , hydrazine acetate prepared *in situ* (0.43 mL of hydrazine monohydrate and 0.23 mL of acetic acid) was added. The mixture was stirred at room temperature for 72 hours. The reaction mixture was then diluted in 5% citric acid (20 mL), and washed with  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  and brine. The organic phase was dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered and concentrated to dryness. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-EtOAc 2:1) to afford **12** as a white foam (741 mg, 57%). TLC (hexane - EtOAc 3:1)  $R_f$  0.27. Spectroscopic data were in agreement with those reported in the literature.<sup>78a</sup>

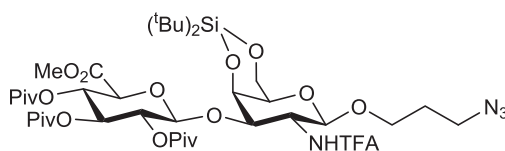
**O-(Methyl 2,3,4-tri-O-pivaloyl- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranosuronate) trichloroacetimidate (3):**<sup>78</sup>



Compound **12** (616 g, 1.34 mmol) and activated  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.25g 9.07 mmol) were dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7.5 mL). After stirring at room temperature for

20 minutes,  $\text{Cl}_3\text{CCN}$  (1.3 mL, 13.4 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature overnight. The residue was purified by column chromatography on silica gel (hexane-EtOAc 10:1) to afford **3** as a white foam (592 mg, 74%). TLC (hexane - EtOAc 2:1)  $R_f$  0.48. Spectroscopic data were in agreement with those reported in the literature.<sup>78a</sup>

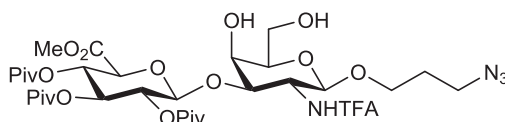
**3-Azidopropyl 3-O-(methyl 2,3,4-tri-O-pivaloyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-4,6-O-di-*tert*-butylsilylene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside (13):**



Donor **3** (111 mg, 0.184 mmol) and acceptor **4** (61 mg, 0.122 mmol) were co-evaporated with toluene, concentrated under vacuum and dissolved in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.5 mL) in the presence of freshly activated 4Å molecular sieves (110 mg). After stirring for 15 min at 0 °C, TMSOTf (100  $\mu\text{L}$  of a 0.18 M solution in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) was added under argon atmosphere. After stirring for 30 min at 0°C, the reaction mixture was neutralized with  $\text{Et}_3\text{N}$ , filtered, and concentrated to dryness. The residue was purified by column chromatography on silica gel (toluene-acetone 18:1) to afford **13** as a colorless oil (92 mg, 82%). TLC (toluene-acetone 18:1)  $R_f$  0.29;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.17 (d, 1H,  $J_{2,\text{NH}}$  = 6.8 Hz, NH), 5.34 (d, 1H,  $J_{1,2}$  = 7.8 Hz, H-1'), 5.27 (t, 1H,  $J_{2,3}$  =  $J_{3,4}$  = 9.3 Hz, H-3'), 5.20 (t, 1H,  $J_{4,5}$  = 9.6 Hz, H-4'), 5.05-5.00 (m, 2H, H-2', H-1), 4.65 (d, 1H,  $J_{3,4}$  = 2.4 Hz, H-4), 4.43 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  = 11.4 Hz,

$J_{3,4} = 2.4$  Hz, H-3), 4.26 (m, 2H, H-6), 3.98 (d, 1H,  $J_{4,5} = 9.6$  Hz, H-5'), 3.90 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.80 (m, 1H, H-2), 3.73 (s, 3H, CO<sub>2</sub>Me), 3.60 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.45 (bs, 1H, H-5), 3.35 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.82 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.15-1.08 (s, 45H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177.0, 176.6, 176.3, 167.4 (4 x CO), 157.7 (q,  $J_{C,F} = 37.8$  Hz, COCF<sub>3</sub>), 115.6 (q,  $J_{C,F} = 288.3$  Hz, COCF<sub>3</sub>), 99.0, 98.9 (C-1, C-1'), 74.2, 74.0 (C-3, C-4), 72.0, 71.9 (C-5', C-3'), 71.3, 71.0 (C-2', C-5), 69.0 (C-4'), 67.0 (C-6), 66.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 54.5 (C-2), 52.9 (CO<sub>2</sub>Me), 48.2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 38.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.1 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 27.5-27.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.3, 20.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); HR-MS:  $m/z$  calcd for C<sub>41</sub>H<sub>67</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>15</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup>: 963.4216; found: 963.4175

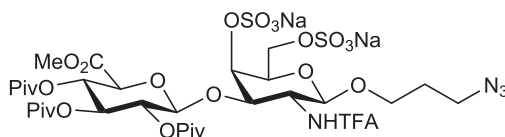
**3-Azidopropyl 3-O-(methyl 2,3,4-tri-O-pivaloyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside (14):**



An excess of (HF)<sub>n</sub>·Py (2.9 mL, 111.3 mmol) was added at 0°C under argon atmosphere to a solution of **13** (542 mg, 0.576 mmol) in dry THF (20 mL). After 20 h at 0°C, the mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and washed with H<sub>2</sub>O and saturated NaHCO<sub>3</sub> solution until neutral pH. The organic layers were dried (MgSO<sub>4</sub>), filtered and concentrated under vacuum to give **14** (455 mg, 99%) as a white amorphous solid. TLC (hexane-EtOAc 2:3) R<sub>f</sub> 0.20; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 5:1):  $\delta$  5.31 (t, 1H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$  Hz, H-3'), 5.16 (t,

$^1\text{H}$ ,  $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6$  Hz, H-4'), 5.02 (m, 1H, H-2'), 4.82 (d, 1H,  $J_{1,2} = 7.8$  Hz, H-1'), 4.47 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.3$  Hz, H-1), 4.16 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10.9$  Hz,  $J_{3,4} = 3.0$  Hz, H-3), 4.12 (d, 1H,  $J_{4,5} = 10.0$  Hz, H-5'), 4.04 (m, 1H, H-4), 3.95-3.89 (m, 2H, H-2, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.83-3.71 (m, 5H, 2 x H-6, CO<sub>2</sub>Me), 3.54-3.48 (m, 2H, H-5, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.35-3.31 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.78 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.12-1.09 (s, 27H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD 5:1):  $\delta$  177.6, 177.2, 177.0, 167.8 (4 x CO), 158.0 (q,  $J_{\text{C,F}} = 37.8$  Hz, COCF<sub>3</sub>), 115.8 (q,  $J_{\text{C,F}} = 288.3$  Hz, COCF<sub>3</sub>), 100.5 (C-1), 99.9 (C-1'), 76.1 (C-3), 74.5 (C-5), 72.1 (C-5'), 71.6 (C-3'), 71.0 (C-2'), 69.3 (C-4'), 68.1 (C-4), 66.1 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 61.4 (C-6), 52.8, 52.7 (CO<sub>2</sub>Me, C-2), 47.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 38.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 26.9-26.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); HR-MS:  $m/z$  calcd for C<sub>33</sub>H<sub>51</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>15</sub> [ $M+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>: 823.3195; found: 823.3191

**3-Azidopropyl 3-O-(methyl 2,3,4-tri-O-pivaloyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-2-deoxy-4,6-di-O-sulfo-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside (2):**

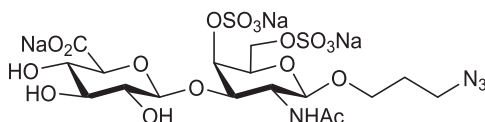


Compound **14** (121.1 mg, 0.151 mmol) and sulfur trioxide–trimethylamine complex (444 mg, 3.19 mmol) were dissolved in dry DMF (10 mL) and heated at 100°C for 30 min using microwave radiation (20 W average power). The reaction vessel was cooled and Et<sub>3</sub>N (500  $\mu$ L), MeOH (1 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) were added. The solution was layered on the top of a



Sephadex LH 20 chromatography column which was eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) to obtain **2** as triethylammonium salt. Further elution from a column of Dowex 50WX4-Na<sup>+</sup> (MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1) afforded **2** as sodium salt (142 mg, 94%). TLC (EtOAc/pyridine/H<sub>2</sub>O/AcOH 15:5:3:1) R<sub>f</sub> 0.30; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 5.38-5.31 (m, 2H, H-3', H-4'), 5.22-5.16 (m, 1H, H-2'), 4.99-4.95 (m, 2H, H-1', H-4), 4.50-4.41 (m, 2H, H-1, H-6a), 4.30-4.22 (m, 2H, H-5', H-6b), 4.19-4.06 (m, 2H, H-2, H-3), 4.02-3.93 (m, 2H, H-5, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3H, CO<sub>2</sub>Me), 3.62-3.54 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.37 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.90-1.73 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.18-1.10 (s, 27H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, selected data obtained from HSQC experiment, CD<sub>3</sub>OD): δ 101.2 (C-1), 100.3 (C-1'), 75.3 (C-4), 74.4 (C-3), 72.9 (C-5), 72.5 (C-3'), 71.9 (C-5'), 71.4 (C-2'), 69.5 (C-4'), 67.6 (C-6), 65.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 52.5 (C-2), 52.0 (CO<sub>2</sub>Me), 47.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 26.0-26.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); ESI MS: *m/z* calcd for C<sub>33</sub>H<sub>49</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>21</sub>S<sub>2</sub>: 1004.2; found: 959.2 [*M*-2Na+H]<sup>-</sup>.

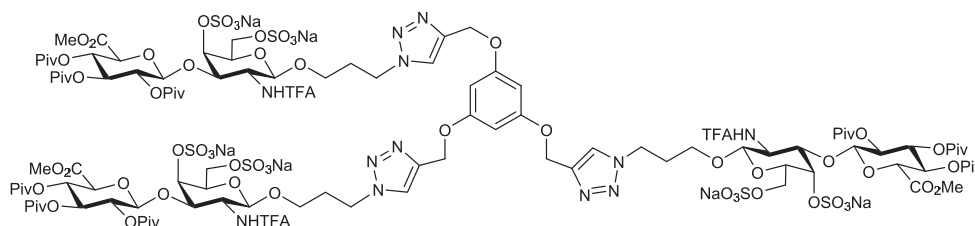
**3-Azidopropyl 3-O-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-2-acetamido-2-deoxy-4,6-di-O-sulfo-β-D-galactopyranoside (1):**



Compound **2** (96 mg, 0.096 mmol) was dissolved in MeOH (9.5 mL) and NaOH 2M (4.5 mL) was added at 0°C. After stirring for 48 hours at room temperature, Amberlite acidic resin was added until pH 7. The Amberlite resin was filtered off, and the solvent was removed under vacuum. The

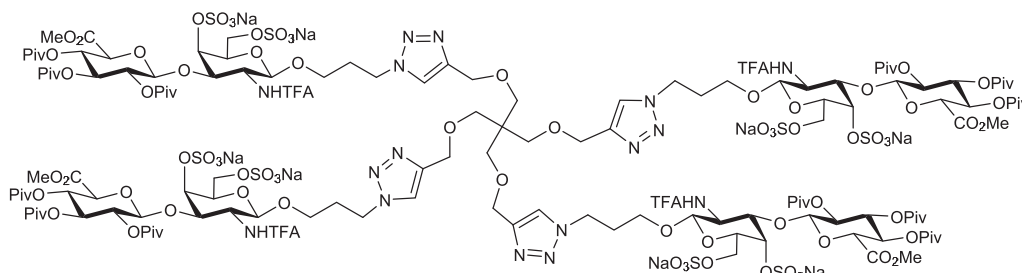
residue was dissolved in MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 (13 mL), and triethylamine (0.15 mL) and acetic anhydride (0.16 mL) were added at 0°C. After stirring at room temperature for 6 hours, the reaction mixture was concentrated under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 15:5:3) to give **1** as a triethylammonium salt. Finally, elution from an ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> column (H<sub>2</sub>O-MeOH 9:1) gave **1** as a sodium salt (62 mg, 92%). TLC (EtOAc/pyridine/H<sub>2</sub>O/AcOH 6:5:3:1) R<sub>f</sub> 0.23; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 4.76 (d, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = 2.2 Hz, H-4), 4.47 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 7.9 Hz, H-1), 4.43 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 7.7 Hz, H-1'), 4.23 (m, 1H, H-6a), 4.13 (m, 1H, H-6b), 4.05-3.99 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 3.93 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.65 (m, 2H, H-5', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.49 (t, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 9.3 Hz, H-4'), 3.40 (t, 1H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.1 Hz, H-3'), 3.33-3.28 (m, 3H, H-2', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, NHAc), 1.80 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 175.9, 174.7 (CO), 103.2 (C-1'), 101.2 (C-1), 76.4 (C-5'), 76.2 (C-4), 75.1 (C-3'), 74.5 (C-3 or C-5), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5 or C-3), 71.8 (C-4'), 67.9 (C-6), 67.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 51.7 (C-2), 47.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.1 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 22.2 (NHAc); ESI MS: *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>18</sub>S<sub>2</sub>: 706.0; found: 683.0 [*M*-Na]<sup>-</sup>.

#### Dendrimer 19:



To a solution of **2** (16 mg, 0.014 mmol) and **16** (1.0 mg,  $4.2 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO (0.5 mL) were added a solution of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.3 mg,  $1.25 \times 10^{-3}$  mmol) and TBTA (1.3 mg,  $2.5 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO (0.5 mL) and a solution of AscNa (0.7 mg,  $3.7 \times 10^{-3}$  mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1 mL). The solution was stirred at 60 °C using MW for 45 min. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using MeOH as eluent and by ion exchange DOWEX  $\text{Na}^+$  column ( $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH 1:1) to give **19** as a sodium salt (8.6 mg, 63%). TLC (EtOAc-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  20:5:3)  $R_f$  0.34;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8.08 (s, 3H, Htriazol), 6.34 (s, 3H, Haromatic core), 5.32 (m, 6H, H-3', H-4'), 5.21-5.14 (m, 9H, H-2', Triazol- $\text{CH}_2$ -O), 4.99 (d, 3H,  $J_{1,2} = 7.8$  Hz, H-1'), 4.94 (d, 3H,  $J_{3,4} = 2.8$  Hz, H-4), 4.54 – 4.39 (m, 12H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol, H-1, H-6a), 4.32-4.10 (m, 12H, H-3, H-5', H-6b, H-2), 3.96 (m, 3H, H-5), 3.85 (m, 3H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 3.74 (s, 9H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.55 (m, 3H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 2.14 (m, 6H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 1.14 (s, 27H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.10 (s, 54H, 2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  178.4, 178.2 (2 x CO), 169.7, 161.6 (Caromatic core-O), 126.0 (CHtriazol), 102.7 (C-1), 101.7 (C-1'), 96.6 (CHaromatic core), 76.9 (C-4), 75.8 (C-3), 74.4 (C-5), 73.0 (C-3' or C-4'), 72.6 (C-5'), 72.7 (C-2'), 70.9 (C-4' or C-3'), 69.1 (C-6), 67.2 (O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 62.4 (Triazol- $\text{CH}_2$ -O), 53.7, 53.6 ( $\text{CO}_2\text{Me}$ , C-2), 49.0 (O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 39.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) 31.6 (O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 27.7, 27.6, 27.5 (3 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); ESI MS:  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{114}\text{H}_{159}\text{F}_9\text{N}_{12}\text{Na}_6\text{O}_{66}\text{S}_6$ : 3252.7; found: 3230.6 [ $M\text{-Na}$ ] $^-$ .

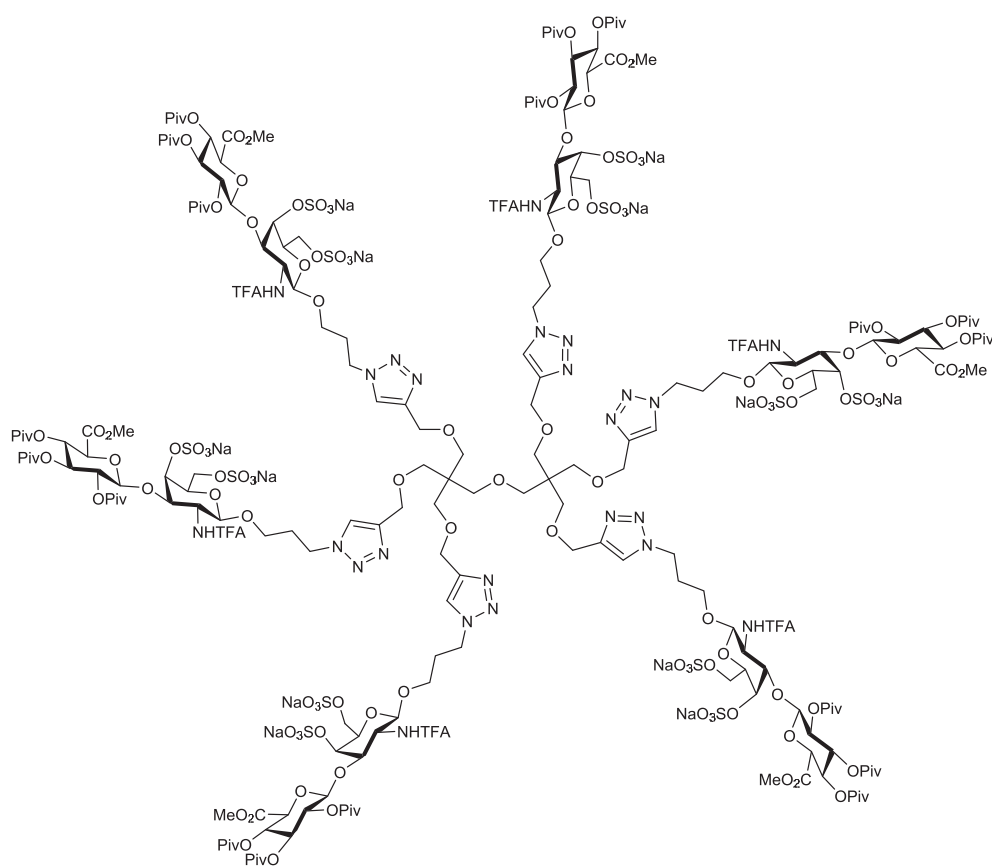
**Dendrimer 20:**



To a solution of **2** (19 mg, 0.019 mmol) and **17** (1.14 mg,  $4.0 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO (0.5 mL) were added a solution of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1.3 mg,  $5.2 \times 10^{-3}$  mmol) and TBTA (5.3 mg,  $10.3 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  5:2 (0.35 mL) and a solution of AscNa (3 mg, 0.015 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1 mL). The solution was stirred at 60 °C using MW for 50 min. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using MeOH as eluent. The resulting residue was further purified by silica gel column chromatography (EtOAc-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  30:5:3) and then eluted from a column of DOWEX  $\text{Na}^+$  ( $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH 1:1) to afford **20** as a sodium salt (10.5 mg, 62%). TLC (EtOAc-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  20:5:3) Rf 0.18;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.90 (s, 4H, Htriazol), 5.34 (t, 4H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1$  Hz, H-3'), 5.28 (m, 4H, H-4'), 5.18 (t, 4H,  $J_{1,2} = 8.0$  Hz,  $J_{2,3} = 9.0$  Hz, H-2'), 5.01 (d, 4H,  $J_{1,2} = 7.9$  Hz, H-1'), 4.95 (d, 4H,  $J_{3,4} = 2.6$  Hz, H-4), 4.57 (d, 4H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz, H-1), 4.50 (s, 8H, Triazol- $\text{CH}_2$ -O), 4.43-4.17 (m, 24H, H-3, H-5', H-6, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 4.20 (m, 4H, H-2), 3.96 (m, 4H, H-5), 3.89 (m, 4H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 3.76 (s, 12H,  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), 3.59 (m, 4H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 3.43 (s, 8H,  $\text{CH}_2$  pentaerythritol core), 2.10 (m, 8H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 1.15 (s, 36H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.10 (m, 72H, 2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  178.3, 178.2, 169.9 (CO), 146.2 (Ctriazol),

125.2 (CHtriazol), 102.6 (C-1), 101.7 (C-1'), 77.0 (C-4), 75.8 (C-3), 74.5 (C-5), 74.1 (C-3'), 73.1 (C-5'), 72.7 (C-2'), 71.0 (C-4'), 69.8 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 69.2 (C-6), 67.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 65.2 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 53.7 (CO<sub>2</sub>Me), 53.3 (C-2), 48.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 39.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 27.7-27.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); ESI MS: *m/z* calcd for C<sub>149</sub>H<sub>216</sub>F<sub>12</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>8</sub>O<sub>88</sub>S<sub>8</sub>: 4304.97; found: 1398.01 [*M*-5Na+2H]<sup>3-</sup>.

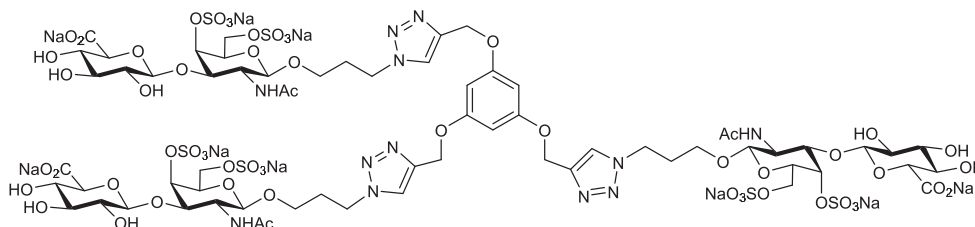
### Dendrimer 21:



To a solution of **2** (17 mg, 0.017 mmol) and **18** (1.14 mg,  $2.4 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO (0.5 mL) were added a solution of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1.2 mg,  $4.9 \times 10^{-3}$  mmol) and TBTA (4.9 mg,  $9.5 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  5:2 (0.35 mL) and a solution of AscNa (2.7 mg, 0.013 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1 mL). The solution was stirred at 60 °C using MW for 50 min. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using MeOH as eluent. The resulting residue was further purified by silica gel column chromatography (EtOAc-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  30:5:3) and then eluted from a column of DOWEX  $\text{Na}^+$  ( $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH 1:1) to afford **21** as a sodium salt (13 mg, 85%). TLC (EtOAc-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  20:5:3) Rf 0.26;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.92 (s, 6H, Htriazol), 5.34 (t, 6H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.2$  Hz, H-3'), 5.27 (t, 6H,  $J_{4,5} = 9.5$  Hz, H-4'), 5.18 (t, 6H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz,  $J_{2,3} = 8.9$  Hz, H-2'), 5.01 (d, 6H,  $J_{1,2} = 7.8$  Hz, H-1'), 4.96 (s, 6H, H-4), 4.57 (d, 6H,  $J_{1,2} = 8.2$  Hz, H-1), 4.49 (s, 12H, Triazol- $\text{CH}_2$ -O), 4.41-4.27 (m, 36H, H-3, H-5', H-6a, H-6b, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 4.19 (m, 6H, H-2), 3.98-3.84 (m, 12H, H-5, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 3.76 (s, 18H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.57 (m, 6H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 3.43 (s, 12H,  $\text{CH}_2$  pentaerythritol core), 3.32 (m, 4H, C- $\text{CH}_2$ -O- $\text{CH}_2$ -C pentaerythritol core), 2.22-2.00 (m, 12H, O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 1.15 (s, 54H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.10 (m, 108H,  $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, selected data obtained from the HSQC,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  124.7 (CHtriazol), 102.4 (C-1), 101.4 (C-1'), 76.7 (C-4), 75.4 (C-3), 74.1 (C-5), 73.7 (C-3'), 72.8 (C-5'), 72.3 (C-2'), 70.7 (C-4'), 70.6 (C- $\text{CH}_2$ -O- $\text{CH}_2$ -C pentaerythritol core), 70.0 ( $\text{CH}_2$  pentaerythritol core), 68.8 (C-6), 66.8 (O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol), 65.1 (Triazol- $\text{CH}_2$ -O), 53.4 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 53.0 (C-2), 48.0 (O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -Triazol),

31.3 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 27.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); MALDI-ToF MS<sup>120</sup>: *m/z* calcd for C<sub>226</sub>H<sub>328</sub>F<sub>18</sub>N<sub>24</sub>Na<sub>12</sub>O<sub>133</sub>S<sub>12</sub>: 6507.5; found: 5364.6 [*M*-11SO<sub>3</sub>Na-Na+11H]<sup>-</sup>.<sup>121</sup>

#### Dendrimer 22:



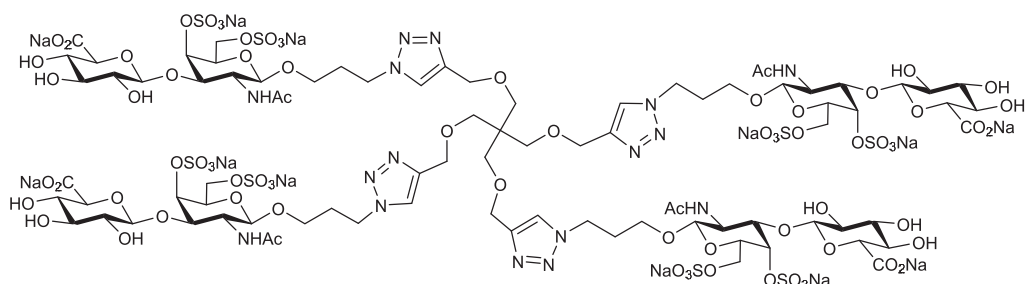
To a solution of **1** (9.7 mg, 0.014 mmol) and **16** (0.8 mg, 3.3 x 10<sup>-3</sup> mmol) in DMSO/PBS buffer (10 mM) 3:1 (0.5 mL) were added a solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (3.0 mg, 0.012 mmol) and TBTA (12.6 mg, 0.024 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (7.0 mg, 0.036 mmol) in PBS(0.12 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was first purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and then eluted from an ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> column (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **22** as a sodium salt (7.7 mg, quant.). TLC (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 6:5:3) R<sub>f</sub> 0.29; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ8.00 (s, 3H, H<sub>triazol</sub>), 6.36 (s, 3H, H<sub>aromatic core</sub>), 5.16 (s, 6H, Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 4.76 (s, 3H, H-4), 4.42 (m, 12H, H-1, H-1', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.28-4.08 (m, 6H, H-6a, H-6b), 4.06-3.92 (m, 9H, H-2, H-3, H-5), 3.87-3.77 (m, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.59 (d, 3H, J<sub>4,5</sub> = 9.4 Hz, H-5'),

<sup>120</sup> As a matrix, it was used 2,5-dihydroxybenzoic acid.

<sup>121</sup> Usually GAGs lose sulfate groups when they are ionized by MALDI-ToF.

3.53-3.36 (m, 9H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.34-3.25 (m, 3H, H-2'), 2.20-2.03 (m, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.96 (s, 9H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 174.8 (CO), 159.5 (Caromatic core-O), 143.0 (Ctriazol), 125.2 (CHtriazol), 103.3 (C-1 or C-1'), 101.2 (C-1' or C-1), 96.6 (CHaromatic core), 76.3 (C-5'), 76.2 (C-4), 75.1 (C-3'), 74.7 (C-3), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.8 (C-4'), 67.9 (C-6), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 61.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.7 (C-2), 47.1 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 29.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.3 (NHAc); ESI MS: *m/z* calcd for C<sub>66</sub>H<sub>87</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>9</sub>O<sub>57</sub>S<sub>6</sub>: 2358.2; found: 1123.2 [M-5Na+3H]<sup>2-</sup>.

### Dendrimer 23:

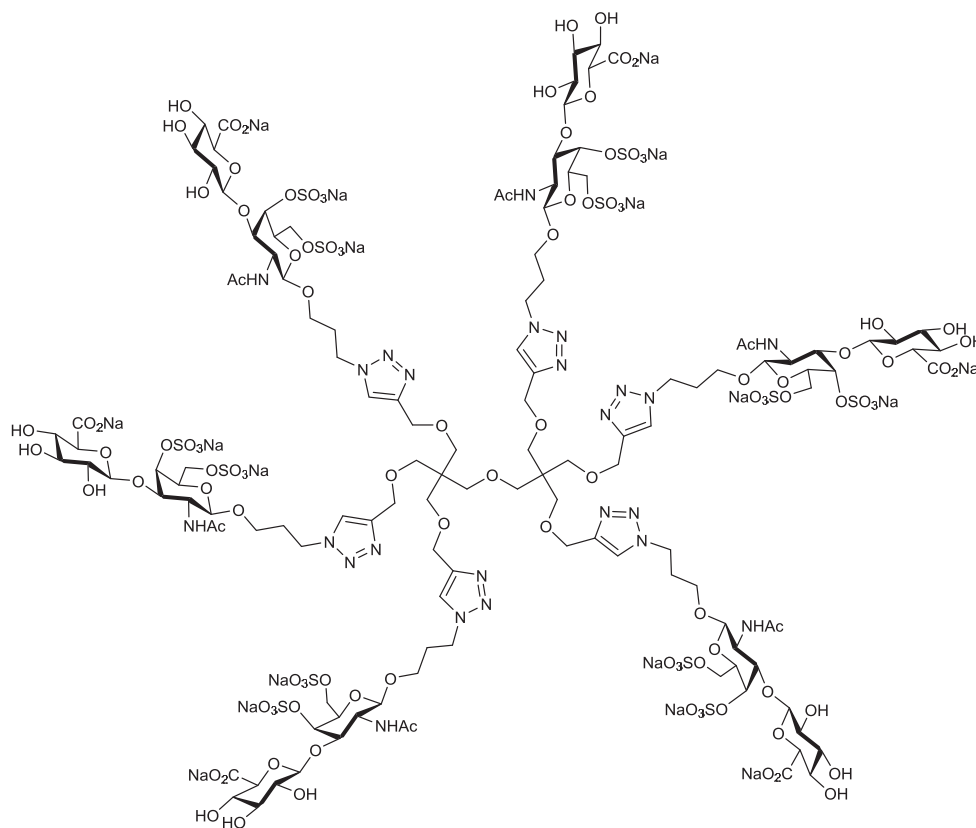


To a solution of **1** (11.8 mg, 0.017 mmol) and **17** (1.0 mg, 3.5 x 10<sup>-3</sup> mmol) in DMSO/PBS buffer (10 mM) 3:1 (0.5 mL) were added a solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (3.7 mg, 0.015 mmol) and TBTA (15.4 mg, 0.030 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (8.5 mg, 0.044 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was first purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and then eluted from an ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> column (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **23** as a sodium salt (9.7 mg, 90%). TLC (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 6:5:3) R<sub>f</sub> 0.19; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,



D<sub>2</sub>O):  $\delta$  7.86 (s, 4H, Htriazol), 4.77 (s, 4H, H-4), 4.51-4.40 (m, 16H, H-1, H-1', Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 4.40-4.30 (m, 8H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.27-4.07 (m, 8H, H-6a, H-6b), 4.06-3.95 (m, 12H, H-2, H-3, H-5), 3.88-3.78 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.60 (d, 4H,  $J_{4,5} = 9.2$  Hz, H-5'), 3.55-3.37 (m, 12H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.37-3.25 (m, 12H, H-2', CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.16-2.02 (m, 8H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.96 (s, 12H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  175.9, 174.7 (CO), 144.0 (Ctriazol), 124.8 (CHtriazol), 103.3 (C-1'), 101.2 (C-1), 76.2 (C4, C5'), 75.1 (C-3'), 74.8 (C-3), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.8 (C-4'), 68.0 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 67.9 (C-6), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.7 (C-2), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 29.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.3 (NHAc); ESI MS:  $m/z$  calcd for C<sub>85</sub>H<sub>120</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>12</sub>O<sub>76</sub>S<sub>8</sub>: 3112.3; found: 992.4 [ $M-6Na+3H$ ]<sup>3-</sup>.

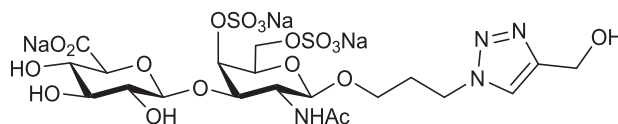
**Dendrimer 24:**



To a solution of **1** (11.2 mg, 0.016 mmol) and **18** (0.8 mg,  $1.7 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO/PBS buffer (10 mM) 3:1 (0.5 mL) were added a solution of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (2.6 mg, 0.010 mmol) and TBTA (11.1 mg, 0.020 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (6.1 mg, 0.030 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was first purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  9:1 as eluent and then eluted from an ion exchange DOWEX  $\text{Na}^+$  column ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  9:1) to afford **24** as a sodium salt

(7.6 mg, quant.). TLC (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 6:5:3) R<sub>f</sub> 0.18; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.85 (s, 6H, Htriazol), 4.77 (s, 6H, H-4), 4.52-4.29 (m, 36H, H-1, H-1', Triazol-CH<sub>2</sub>-O, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.27-4.07 (m, 12H, H-6a, H-6b), 4.06-3.95 (m, 18H, H-2, H-3, H-5), 3.89-3.78 (m, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.62 (d, 6H, *J*<sub>4,5</sub> = 8.8 Hz, H-5'), 3.55-3.38 (m, 18H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.38-3.24 (m, 18H, H-2', CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 3.18 (s, 4H, C-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C pentaerythritol core), 2.16-2.01 (m, 12H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.96 (s, 18H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 175.9, 174.7 (2 x CO), 144.1 (Ctriazol), 124.7 (CHtriazol), 103.4 (C-1'), 101.2 (C-1), 76.3 (C4, C5'), 75.1 (C-3'), 75.0 (C-3), 72.6 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.9 (C-4'), 68.4 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 67.9 (C-6), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.6 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.7 (C-2), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol) 45.0, 29.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.4 (NHAc); ESI MS: *m/z* calcd for C<sub>130</sub>H<sub>184</sub>N<sub>24</sub>Na<sub>18</sub>O<sub>115</sub>S<sub>12</sub>: 4718.4; found: 1528.8 [*M*-6Na+3H]<sup>3-</sup>.

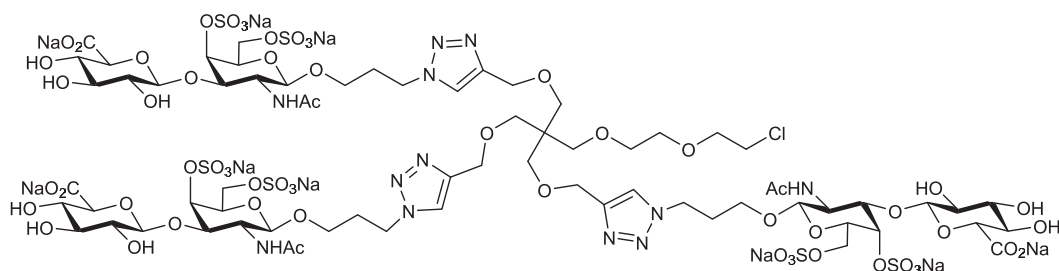
#### Disaccharide 26:



To a solution of **1** (8.4 mg, 0.012 mmol) and propargyl alcohol (1.4 μL, 0.024 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) were added a solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (3.1 mg, 0.012 mmol) and TBTA (13.3 mg, 0.024 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (8.0 mg, 0.040 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM). The solution was stirred at room

temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was first purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and then eluted from an ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> column (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **26** as a sodium salt (9.6 mg, quant.). TLC (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 12:5:3) R<sub>f</sub> 0.21; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.89 (s, 1H, H<sub>triazol</sub>), 4.76 (s, 1H, H-4), 4.65 (s, 2H, Triazol-CH<sub>2</sub>-OH), 4.45-4.42 (m, 4H, H-1, H-1', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.25-4.11 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.04-3.99 (m, 3H, H-2, H-3, H-5), 3.85-3.80 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.63 (d, 1H, *J*<sub>4,5</sub> = 9.6 Hz, H-5'), 3.55-3.45 (m, 2H, H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.40 (t, 1H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.1 Hz, H-3'), 3.31 (t, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 8.4 Hz, H-2'), 2.13-2.10 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.96 (s, 3H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 175.4, 174.7 (2 x CO), 124.7 (CH<sub>triazol</sub>), 103.2 (C-1'), 101.1 (C-1), 76.2 (C-4, C-5'), 75.1 (C-3'), 74.7 (C-3), 72.4 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.7 (C-4'), 68.0 (C-6), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 54.6 (Triazol-CH<sub>2</sub>-OH), 51.7 (C-2), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol) 29.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.3 (NHAc); ESI MS: *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>19</sub>S<sub>2</sub>: 762.1; found: 739.0 [*M*-Na]<sup>-</sup>

### Dendron 29:

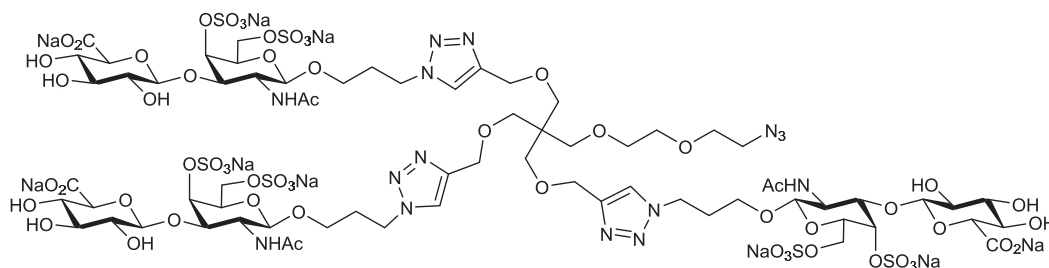


A solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (17 mg, 0.07 mmol) and TBTA (69.7 mg, 0.13 mmol) in DMSO/PBS buffer 7:1 (3.25 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (38.1 mg, 0.19 mmol) in PBS (0.4 mL, 10 mM) were added to a solution of **1**

(97 mg, 0.14 mmol) and **28** (10.9 mg, 0.03 mmol) in DMSO/PBS buffer 8:5 (3.15 mL, 1.0 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **29** as a sodium salt (57 mg, 75%); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.92 (s, 3H, H<sub>triazol</sub>), 4.79 (s, 3H, H-4), 4.58-4.35 (m, 18H, H-1, H-1', Triazol-CH<sub>2</sub>-O, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.39-4.10 (m, 6H, H-6a, H-6b), 4.09-3.96 (m, 9H, H-2, H-3, H-5), 3.92-3.79 (m, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.74-3.63 (m, 5H, H-5', DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl]), 3.63-3.57 (m, 2H, DEG [-CH<sub>2</sub>-Cl]), 3.57-3.42 (m, 13H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.42-3.27 (m, 11H, H-2', CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.11 (m, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.99 (s, 9H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 175.3, 174.7 (2 x CO), 144.1 (C<sub>triazol</sub>), 125.0 (CH<sub>triazol</sub>), 103.4 (C-1'), 101.2 (C-1), 76.2 (C-4), 76.0 (C-5'), 75.1 (C-3, C-3'), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.7 (C-4'), 70.8 (DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl]), 70.3 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 68.3 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 67.9 (C-6), 66.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.7 (C-2), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 44.6 (C pentaerythritol core), 43.4 (DEG [-CH<sub>2</sub>-Cl]), 29.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.4 (NHAc); ESI MS<sup>122</sup>: *m/z* calcd for C<sub>69</sub>H<sub>100</sub>ClN<sub>12</sub>Na<sub>9</sub>O<sub>59</sub>S<sub>6</sub>: 2474.2; found: 1174.3 [*M*-9Na+6H+Et<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>; found: 1209.8 [*M*-9Na+5H+2(Et<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)]<sup>2-</sup>.

<sup>122</sup> This experiment was done using a Et<sub>2</sub>NH solution.

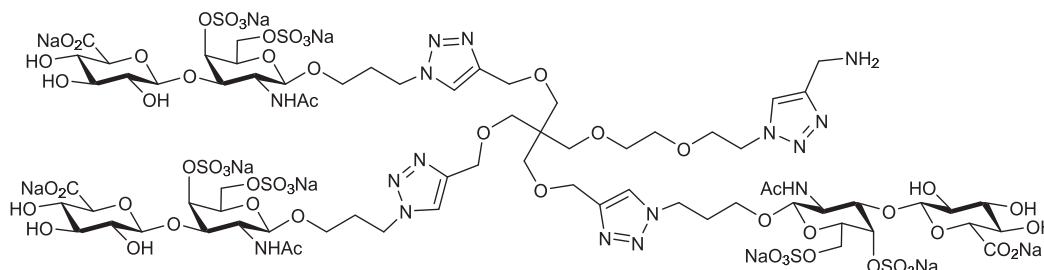
**Dendron 30:**



NaN<sub>3</sub> (50 mg, 0.77 mmol) was added to a solution of **29** (42.9 mg, 0.018 mmol) in DMSO (4 mL). The solution was stirred at 60°C for 4 days. Then, the reaction mixture was purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **30** as a sodium salt (39.9 mg, 93%); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.91 (s, 3H, Htriazol), 4.78 (s, 3H, H-4), 4.56-4.34 (m, 18H, H-1, H-1', Triazol-CH<sub>2</sub>-O, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.28-4.09 (m, 6H, H-6a, H-6b), 4.08-3.95 (m, 9H, H-2, H-3, H-5), 3.90-3.77 (m, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.70-3.61 (m, 3H, H-5'), 3.58 (m, 2H, DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>]), 3.55-3.25 (m, 26H, H-2', H-3', H-4', DEG [-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>], O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.10 (m, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.98 (s, 9H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 175.5, 174.7 (2 x CO), 125.0 (CHtriazol), 103.4 (C-1'), 101.2 (C-1), 76.2 (C-4), 76.1 (C-5'), 75.1 (C-3'), 75.0 (C-3), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.8 (C-4'), 70.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69.3 (DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>]), 68.3 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 67.9 (C-6), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.7 (C-2), 50.2 (DEG [-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>]), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 44.6 (C pentaerythritol core), 29.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.4

(NHAc); ESI MS<sup>122</sup>:  $m/z$  calcd for C<sub>69</sub>H<sub>100</sub>N<sub>15</sub>Na<sub>9</sub>O<sub>59</sub>S<sub>6</sub>: 2481.3; found: 1177.3 [M-9Na+6H+Et<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>.

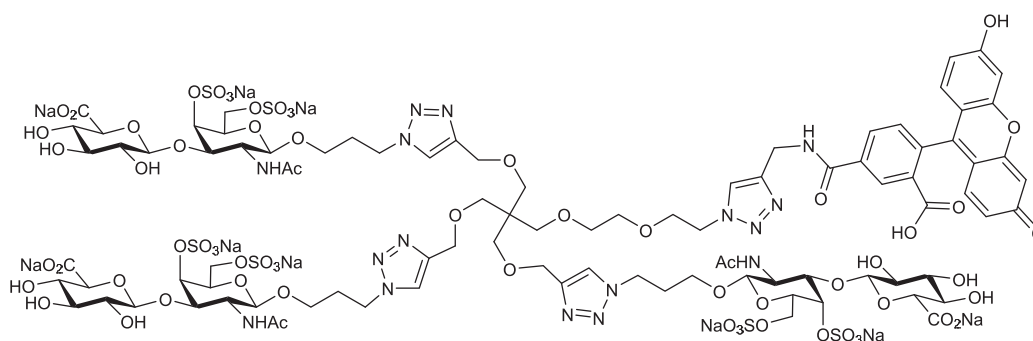
### Dendron 32:



To a solution of **30** (12.8 mg, 0.0051 mmol) and propargylamine (2  $\mu$ L, 0.026 mmol) in DMSO/PBS buffer (10 mM) 3:1 (0.5 mL) were added a solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1.7 mg, 0.0067 mmol) and TBTA (5.9 mg, 0.0108 mmol) in DMSO/PBS (10 mM) 3:1 (0.5 mL) and a solution of AscNa (3.3 mg, 0.0155 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was first purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and then, eluted by ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> resin (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **32** as a sodium salt (10.6 mg, 81%); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.04 (s, 1H, Htriazol), 7.90 (s, 3H, Htriazol), 4.77 (s, 3H, H-4), 4.55-4.32 (m, 20H, Triazol-CH<sub>2</sub>-O, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, DEG [-CH<sub>2</sub>-Triazol], H-1, H-1'), 4.30-4.18 (m, 5H, Triazol-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, H-6a), 4.13 (m, 3H, H-6b), 4.08- 3.92 (m, 9H, H-2, H-3, H-5), 3.91-3.72 (m, 5H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol], 3.63 (d, 3H,  $J_{4,5}$  = 9.3 Hz, H-5'), 3.56-3.23 (m, 22H, H-2', H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 3.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.07 (m, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.96 (s, 9H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, selected

data obtained of HSQC, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  125.1, 125.0 (CHtriazol), 103.3 (C-1'), 101.1 (C-1), 76.2 (C-4, C-5'), 75.1 (C-3'), 74.9 (C-3), 72.5 (C-2'), 72.2 (C-5), 71.7 (C-4'), 70.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 68.7 (DEG O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 67.9 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core, C-6), 66.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.4 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.7 (C-2), 50.2 (DEG [-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 34.0 (Triazol-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 29.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.3 (NHAc).

### Dendron 35:

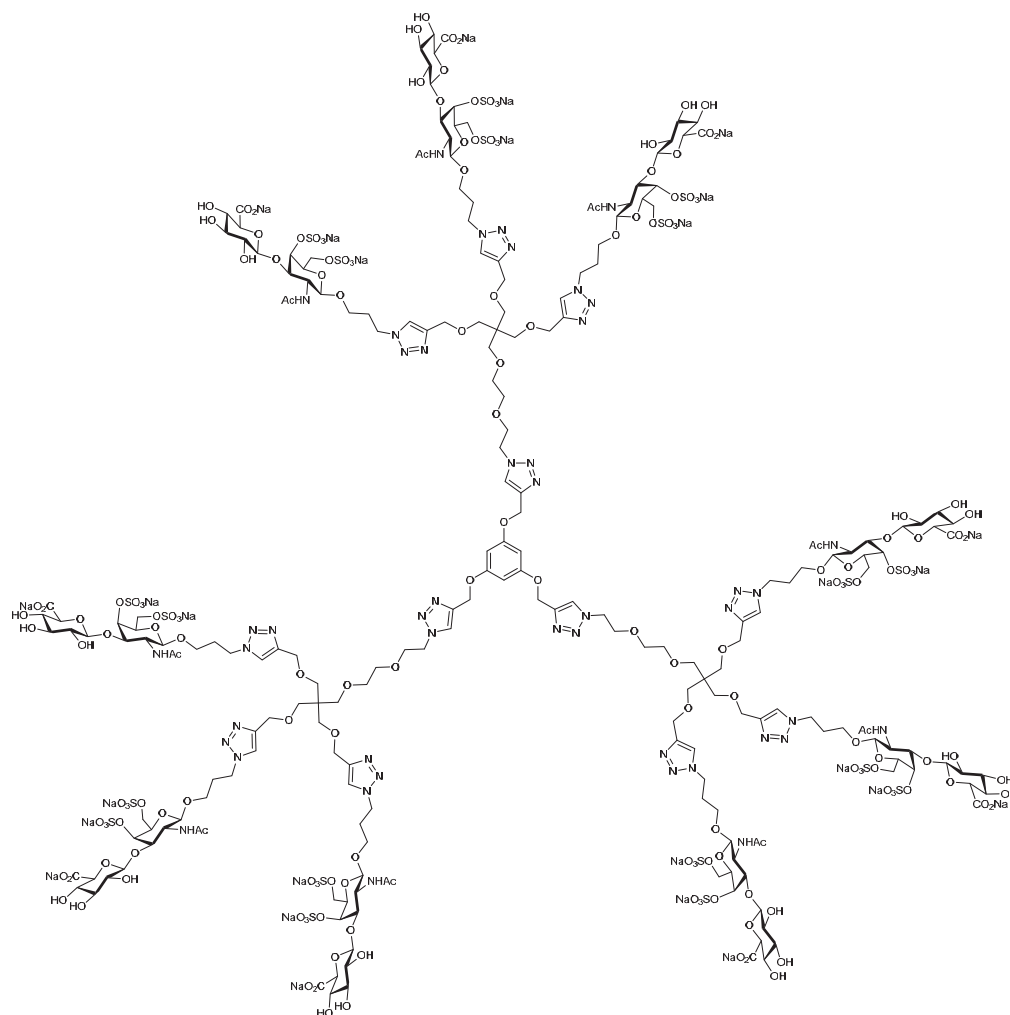


A solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2.0 mg, 0.008 mmol) and TBTA (8.1 mg, 0.015 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (4.5 mg, 0.022 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM) were added to a solution of **30** (8.7 mg, 0.0035 mmol) and **34** (4.6 mg, 0.01 mmol) in DMSO/PBS buffer (10 mM) 3:1 (0.5 mL). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **35** as a sodium salt (10.0 mg, 99%); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.06 (m, 2H, ArH), 7.83 (s, 1H, Htriazol), 7.74 (s, 3H, Htriazol),



7.0 (s, 1H, ArH), 6.88 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, ArH), 6.85-6.74 (m, 3H, ArH), 6.60 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, ArH), 6.50 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz, ArH), 4.74 (s, 3H, H-4), 4.57 (m, 2H, Triazol-CH<sub>2</sub>-NH), 4.50-4.35 (m, 8H, DEG [-CH<sub>2</sub>-Triazol], H-1, H-1'), 4.34-4.17 (m, 15H, Triazol-CH<sub>2</sub>-O, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, H-6a), 4.17-4.07 (m, 3H, H-6b), 3.99 (m, 6H, H-2, H-3), 3.91 (m, 3H, H-5), 3.84-3.69 (m, 5H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 3.60 (d, 3H,  $J_{4,5} = 9.1$  Hz, H-5'), 3.52-3.33 (m, 11H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.29 (t, 3H,  $J = 7.9$  Hz, H-2'), 3.18 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.12-2.95 (m, 8H, CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.07-1.88 (m, 15H, NHAc, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, selected data obtained from HSQC, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  130.8 (ArC), 128.7 (ArC), 126.5 (ArC), 124.2 (CHTriazol), 118.3 (ArC), 103.4 (C-1'), 102.8 (ArC), 101.1 (C-1), 76.2 (C-4, C-5'), 75.1 (C-3'), 74.8 (C-3), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.8 (C-4'), 70.2 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 68.8 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 68.3 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core, DEG O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 67.8 (C-6), 66.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.6 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.7 (C-2), 50.2 (DEG [-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 46.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 35.1 (Triazol-CH<sub>2</sub>-NH), 29.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.3 (NHAc); ESI MS:  $m/z$  calcd for C<sub>93</sub>H<sub>115</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>9</sub>O<sub>65</sub>S<sub>6</sub>: 2894.4; found: 1457.4 [ $M-6Na+4K$ ]<sup>2-</sup>.

Dendrimer 36:

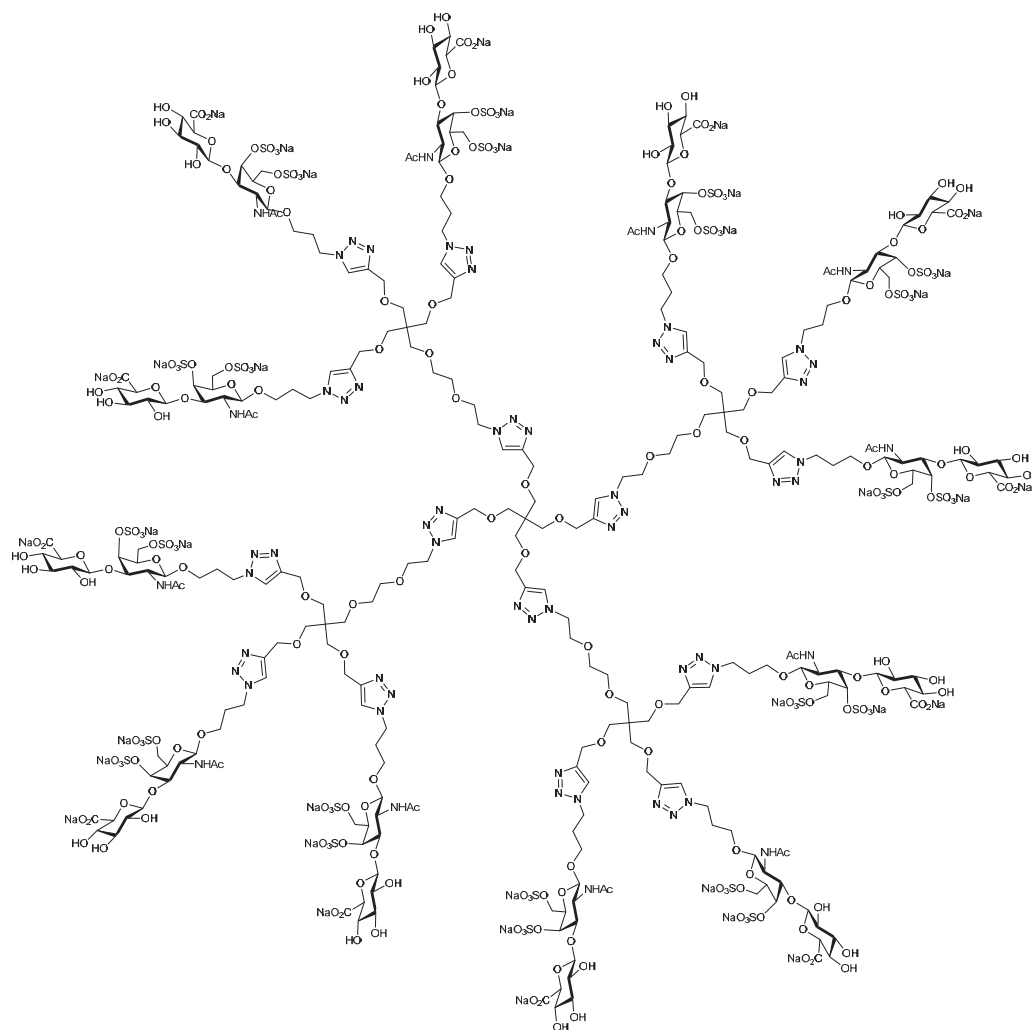


A solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2.2 mg, 0.009 mmol) and TBTA (9.4 mg, 0.017 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (5.2 mg, 0.026 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM) were added to a solution of **30** (20.0 mg, 0.008 mmol) and **16** (0.5 mg, 1.8 x 10<sup>-3</sup> mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction

mixture was purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent, ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) and finally by ultracentrifugation using Amicon Ultracel - 3K filters to afford **36** as a sodium salt (11.3 mg, 78%); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8.06 (s, 3H, Htriazol), 7.84 (s, 9H, Htriazol), 6.26 (s, 3H, H aromatic core), 5.07 (s, 6H, Triazol-CH<sub>2</sub>-O-Benzene), 4.77 (s, 9H, H-4), 4.54 (s, 6H, DEG [-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 4.50-4.27 (m, 54H, H-1, H-1', Triazol-CH<sub>2</sub>-O- pentaerythritol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.26-4.07 (m, 18H, H-6a, H-6b), 4.06-3.93 (m, 27H, H-2, H-3, H-5), 3.91-3.73 (m, 15H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 3.65 (d, 9H, *J*<sub>4,5</sub> = 9.1 Hz, H-5'), 3.55-3.36 (m, 39H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.36-3.19 (m, 33H, H-2', CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.04 (m, 18H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.95 (s, 27H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 175.9, 174.7 (2 x CO), 159.6 (C aromatic core-O), 103.4 (C-1'), 101.2 (C-1), 76.3 (C-4, C-5'), 75.1 (C-3', C-3), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.8 (C-4'), 70.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 68.8 (DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 68.3 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 67.9 (C-6), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O-pentaerythritol), 61.3 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O-benzene), 51.7 (C-2), 50.2 (DEG [-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 44.7 (C pentaerythritol core), 29.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.4 (NHAc); MALDI-ToF MS<sup>123</sup>: *m/z* calcd for C<sub>222</sub>H<sub>312</sub>N<sub>45</sub>Na<sub>27</sub>O<sub>180</sub>S<sub>18</sub>: 7.7 kDa; found: 24.1 kDa [*M*-27Na+(FGF-2)]<sup>+</sup>.

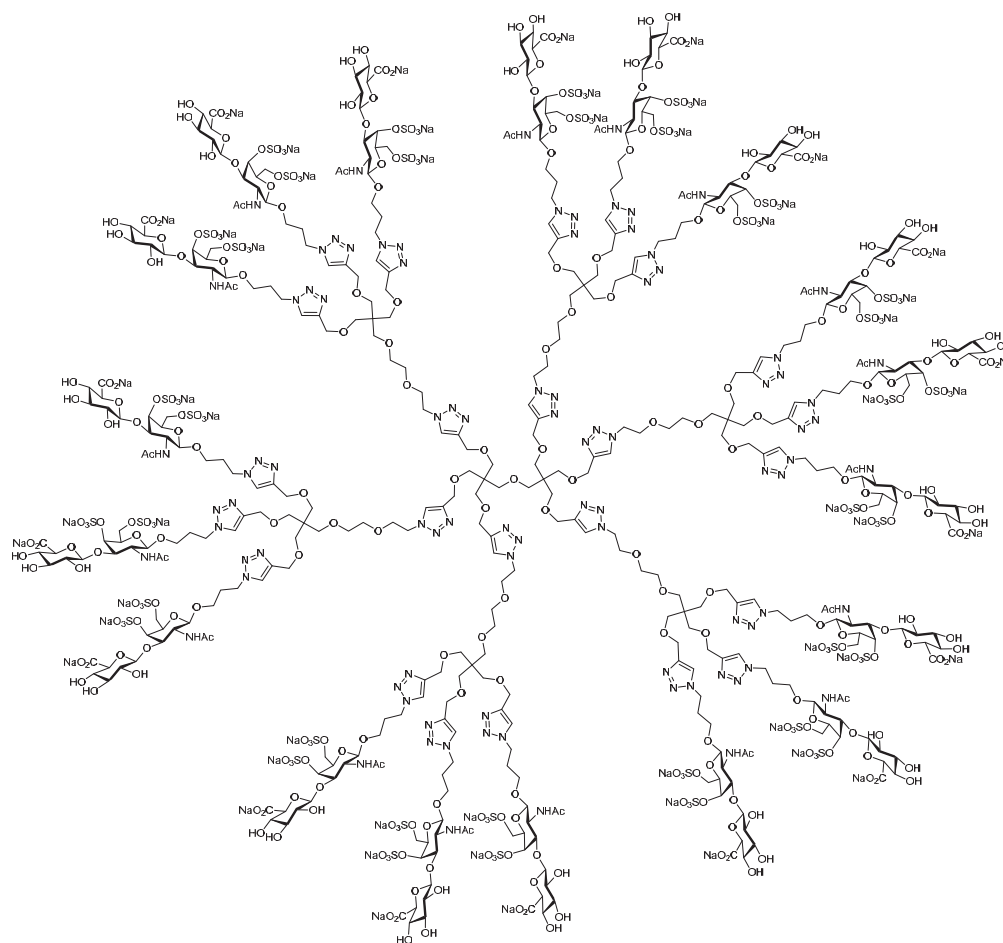
<sup>123</sup> This experiment was done using a FGF-2 solution.

Dendrimer 37:



A solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2.5 mg, 0.01 mmol) and TBTA (10.0 mg, 0.018 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (5.4 mg, 0.027 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM) were added to a solution of **30** (20.0 mg, 0.008 mmol) and **17** (0.4 mg, 1.4 × 10<sup>-3</sup> mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction

mixture was purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent, ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) and finally by ultracentrifugation using Amicon Ultracel - 3K filters to afford **37** as a sodium salt (11.2 mg, 79%); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  7.90 (s, 4H, Htriazol), 7.86 (s, 12H, Htriazol), 4.77 (s, 12H, H-4), 4.55-4.29 (m, 88H, H-1, H-1', Triazol-CH<sub>2</sub>-O- pentaerythritol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, DEG [CH<sub>2</sub>-Triazol]), 4.28-4.09 (m, 24H, H-6a, H-6b), 4.07-3.94 (m, 36H, H-2, H-3, H-5), 3.89-3.77 (m, 20H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 3.70-3.59 (m, 12H, H-5'), 3.55-3.38 (m, 52H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.38-3.21 (m, 52H, H-2', CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.06 (m, 24H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.96 (s, 36H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  175.6, 174.7 (2 x CO), 144.1 (C triazol), 124.9 (CHtriazol), 103.4 (C-1'), 101.1 (C-1), 76.3 (C-4, C-5'), 75.1 (C-3', C-3), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 72.0 (C-4'), 70.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 68.8 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core, DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol]) 68.2 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 67.8 (C-6), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.7 (C-2), 49.9 (DEG [-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 44.7 (C pentaerythritol core), 29.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.4 (NHAc); MALDI-ToF MS<sup>123</sup>:  $m/z$  calcd for C<sub>293</sub>H<sub>420</sub>N<sub>60</sub>Na<sub>36</sub>O<sub>240</sub>S<sub>24</sub>: 10.2 kDa; found: 26.4 kDa [ $M-36\text{Na}+(\text{FGF-2})$ ]<sup>+</sup>.

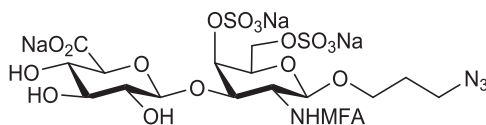
**Dendrimer 38:**

A solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (5.2 mg, 0.02 mmol) and TBTA (21.4 mg, 0.04 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (1 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (11.8 mg, 0.058 mmol) in PBS (0.25 mL, 10 mM) were added to a solution of **30** (20.0 mg, 0.008 mmol) and **18** (0.5 mg, 1.0 × 10<sup>-3</sup> mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.4 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature for 36 h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using

H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent, ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) and finally by ultracentrifugation using Amicon Ultracel - 10K filters to afford **38** as a sodium salt (14.1 mg, 88%); <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.91 (s, 6H, Htriazol), 7.86 (s, 18H, Htriazol), 4.78 (s, 18H, H-4), 4.55-4.39 (m, 96H, H-1, H-1', Triazol-CH<sub>2</sub>-O- pentaerythritol, DEG [-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 4.39-4.29 (m, 36H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.28-4.08 (m, 36H, H-6a, H-6b), 4.07-3.94 (m, 54H, H-2, H-3, H-5), 3.90-3.76 (m, 30H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol]), 3.72-3.62 (m, 18H, H-5'), 3.56-3.39 (m, 78H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.39-3.23 (m, 82H, H-2', CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.05 (m, 36H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 1.96 (s, 54H, NHAc); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 174.7 (CO), 144.1 (C triazol), 124.8 (CHtriazol), 103.5 (C-1'), 101.1 (C-1), 76.3 (C-4), 75.9 (C-5'), 75.3 (C-3), 75.0 (C-3'), 72.5 (C-2'), 72.2 (C-5), 71.7 (C-4'), 70.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O or O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 68.8 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core, DEG [O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol]) 68.2 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 67.8 (C-6), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.6 (C-2), 49.8 (DEG [CH<sub>2</sub>-Triazol]), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 44.7 (C pentaerythritol core), 29.6 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 22.4 (NHAc); MALDI-ToF MS <sup>124</sup> : *m/z* calcd for C<sub>442</sub>H<sub>634</sub>N<sub>90</sub>Na<sub>54</sub>O<sub>361</sub>S<sub>36</sub>: 15.4 kDa; found: 10.2 kDa [*M*-54Na+2(Arg-Gly)<sub>15</sub>]<sup>2+</sup>.

<sup>124</sup> This experiment was done using a (Arg-Gly)<sub>15</sub> solution.

**3-Azidopropyl 3-O-(β-D-glucopyranosyluronic acid)-2-deoxy-2-monofluoroacetamide-4,6-di-O-sulfo-β-D-galactopyranoside (41):**

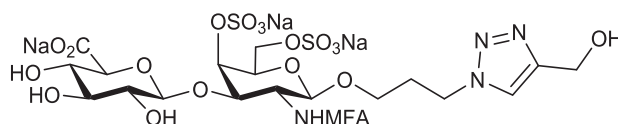


Compound **2** (139 mg, 0.14 mmol) was dissolved in MeOH (16 mL) and NaOH 2M (6.5 mL) was added at 0°C. After stirring for 48 hours at room temperature, Amberlite acidic resin was added until pH 7. The Amberlite resin was filtered off, and the solvent was removed under vacuum. On the other hand, solutions of monofluoroacetic acid (0.5 M), *N*-hydroxysuccinimide (0.5 M) and *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (0.5 M) in DMF were mixed in a 1:1:1 ratio for 15 minutes and then centrifuged. The supernatant (15 mL) was added to a solution of the crude amino product in DMSO (15 mL) and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was concentrated and dissolved in MeOH (12 mL) and NaOMe (0.5 mL of a 2.17 M solution in MeOH) was then added at 0°C. After stirring at room temperature for 4 hours, the crude product was concentrated under vacuum and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 20:5:3) to give **41**, as a sodium salt (29 mg, 29%) after elution with ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> resin (H<sub>2</sub>O-MeOH 9:1). TLC (EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O 12:5:3) R<sub>f</sub> 0.24; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 4.97-4.78 (m, 3H, CH<sub>2</sub>F, H-4), 4.55 (bs, 1H, H-1), 4.43 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 7.7 Hz, H-1'), 4.25 (m, 1H, H-6a), 4.17 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H-6b), 4.14-4.07 (m, 2H, H-2, H-3), 4.07-3.98 (m, 1H, H-5), 3.98-3.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.72-3.67 (m, 2H, H-5', CH<sub>2</sub>), 3.47 (t, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = *J*<sub>4,5</sub> = 9.3 Hz, H-4'), 3.39 (t, 1H, *J*<sub>2,3</sub> = *J*<sub>3,4</sub> = 9.0 Hz H-3'), 3.36-3.23 (m, 3H, H-2', CH<sub>2</sub>), 1.82-1.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 103.2 (C-1'), 100.8 (C-1), 80.0 (d, *J*<sub>C,F</sub> = 182.7 Hz, CH<sub>2</sub>F), 76.3 (C-5'), 76.1 (C-4), 75.1 (C-3'),



74.4 (C-3), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.8 (C-4'), 67.9 (C-6), 67.5 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 51.4 (C-2), 47.8 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); ESI MS: *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>18</sub>S<sub>2</sub>: 724.0; found: 694.8 [*M*-3Na+H+K]<sup>-</sup>.

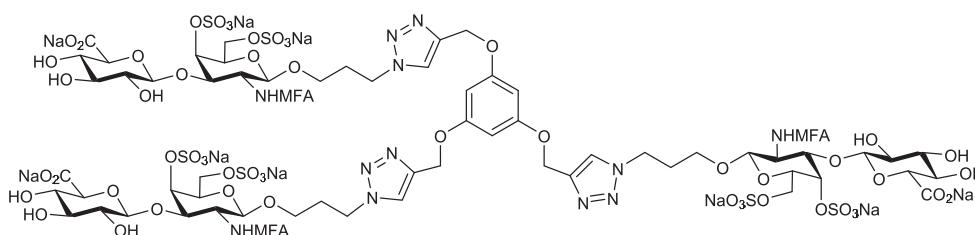
#### Disaccharide **42**:



To a solution of **41** (9.7 mg, 0.013 mmol) and propargyl alcohol (2  $\mu$ L, 0.034 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) were added a solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (3.0 mg, 0.012 mmol) and TBTA (14.0 mg, 0.026 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (8.0 mg, 0.040 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and then by ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **42** as a sodium salt (9.1 mg, 87%). TLC (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 12:5:3) R<sub>f</sub> 0.20; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  7.89 (s, 1H, H<sub>triazol</sub>), 4.87 (d, 2H, *J*<sub>H,F</sub> = 46.4 Hz, CH<sub>2</sub>F), 4.79 (s, 1H, H-4), 4.65 (s, 2H, Triazol-CH<sub>2</sub>-OH), 4.50 (m, 1H, H-1), 4.45-4.38 (m, 3H, H-1', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.30-4.07 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-2, H-3), 4.05-3.98 (m, 1H, H-5), 3.89-3.75 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.61 (d, 1H, *J*<sub>4,5</sub> = 9.6 Hz, H-5'), 3.56-3.50 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.46 (t, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = 9.1 Hz, H-4'), 3.39 (t, 1H, *J*<sub>3,4</sub> = 9.1 Hz, H-3'), 3.29 (t, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 8.0 Hz, H-2'), 2.20-2.05 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  175.7, 171.5 (2 x

CO), 146.7 (Ctriazol), 124.2 (CHtriazol), 103.3 (C-1'), 100.7 (C-1), 80.0 (d,  $J_{C,F}$  = 181.4 Hz, CH<sub>2</sub>F), 76.2 (C-5'), 76.1 (C-4), 75.1 (C-3'), 74.5 (C-3), 72.4 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.7 (C-4'), 67.9 (C-6), 66.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 54.6 (Triazol-CH<sub>2</sub>-OH), 51.4 (C-2), 47.0 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 29.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol); ESI MS<sup>122</sup>:  $m/z$  calcd for C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>FN<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>19</sub>S<sub>2</sub>: 780.1; found: 934.4 [ $M$ -3Na+3(Et<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)+H]<sup>+</sup>.

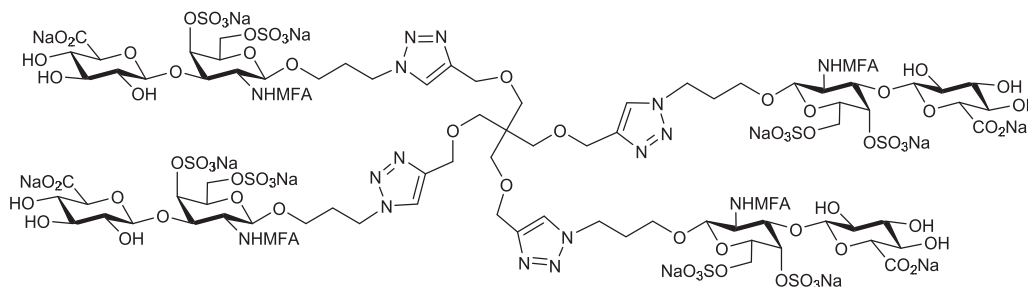
#### Dendrimer 43:



To a solution of **41** (10 mg, 0.014 mmol) and **16** (0.8 mg,  $3.3 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO (0.62 mL) were added a solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2.9 mg, 0.011 mmol) and TBTA (12.4 mg, 0.023 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (7.4 mg, 0.037 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was first purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and then eluted by ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> chromatography (H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **43** as a sodium salt (5.8 mg, 72%). TLC (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 6:5:3) R<sub>f</sub> 0.27; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.00 (s, 3H, Htriazol), 6.35 (s, 3H, H aromatic core), 5.16 (s, 6H, Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 4.87 (d, 6H,  $J_{H,F}$  = 46.3 Hz, CH<sub>2</sub>F), 4.79 (s, 3H, H-4), 4.52-4.35 (m, 12H, H-1, H-1', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.23 (m, 3H, H-6a), 4.19-4.05 (m, 9H, H-6b, H-2, H-3), 4.01-3.95 (m, 3H, H-5),

3.87-3.77 (m, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.64 (d, 3H,  $J_{4,5}$  = 9.5 Hz, H-5'), 3.52-3.35 (m, 9H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.29 (m, 3H, H-2'), 2.11 (bs, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, data obtained from HSQC, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  125.0 (CHtriazol), 103.3 (C-1'), 100.8 (C-1), 96.6 (CHaromatic core), 80.0 (d, CH<sub>2</sub>F), 76.2 (C-5', C-4), 75.1 (C-3'), 74.7 (C-3), 72.5 (C-2'), 72.3 (C-5), 71.8 (C-4'), 68.0 (C-6), 66.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 61.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.4 (C-2), 47.1 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 29.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol); ESI MS:  $m/z$  calcd for C<sub>66</sub>H<sub>84</sub>F<sub>3</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>9</sub>O<sub>57</sub>S<sub>6</sub>: 2412.1; found: 1139.1 [ $M-6Na+4H$ ]<sup>2-</sup>.

#### Dendrimer 44:



To a solution of **41** (13.6 mg, 0.019 mmol) and **17** (1.1 mg,  $3.9 \times 10^{-3}$  mmol) in DMSO (0.62 mL) were added a solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (4.0 mg, 0.016 mmol) and TBTA (17.4 mg, 0.031 mmol) in DMSO/PBS buffer 3:1 (0.5 mL, 10 mM) and a solution of AscNa (9.6 mg, 0.047 mmol) in PBS (0.12 mL, 10 mM). The solution was stirred at room temperature overnight. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was first purified by size exclusion Sephadex LH-20 chromatography using H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1 as eluent and then eluted from an ion exchange DOWEX Na<sup>+</sup> column

(H<sub>2</sub>O/MeOH 9:1) to afford **44** as a sodium salt (6.0 mg, 48%). TLC (EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O 6:5:3) R<sub>f</sub> 0.22; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.90 (s, 4H, Htriazol), 4.87 (d, 8H, *J*<sub>H,F</sub> = 46.4 Hz, CH<sub>2</sub>F), 4.79 (s, 4H, H-4), 4.53 (m, 4H, H-1), 4.50-4.30 (m, 20H, H-1', Triazol-CH<sub>2</sub>-O, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 4.23 (m, 4H, H-6a), 4.19-4.06 (m, 12H, H-2, H-3, H-6b), 4.00 (m, 4H, H-5), 3.89-3.79 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.79-3.69 (m, 4H, H-5'), 3.57-3.37 (m, 12H, H-3', H-4', O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 3.37-3.21 (m, 12H, H-2', CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 2.08 (bs, 8H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, data obtained from HSQC, D<sub>2</sub>O): δ 126.0 (CHtriazol), 103.4 (C-1'), 100.8 (C-1), 80.0 (d, CH<sub>2</sub>F), 76.1 (C-4), 75.6 (C-5'), 75.2 (C-3), 75.0 (C-3'), 72.3 (C-2', C-5), 71.4 (C-4'), 68.0 (CH<sub>2</sub> pentaerythritol core), 67.8 (C-6), 66.7 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 63.5 (Triazol-CH<sub>2</sub>-O), 51.3 (C-2), 46.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol), 29.4 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Triazol); ESI MS: *m/z* calcd for C<sub>85</sub>H<sub>116</sub>F<sub>4</sub>N<sub>16</sub>Na<sub>12</sub>O<sub>76</sub>S<sub>8</sub>: 3184.2; found: 1543.8 [*M*-6Na+3H+K]<sup>2-</sup>.

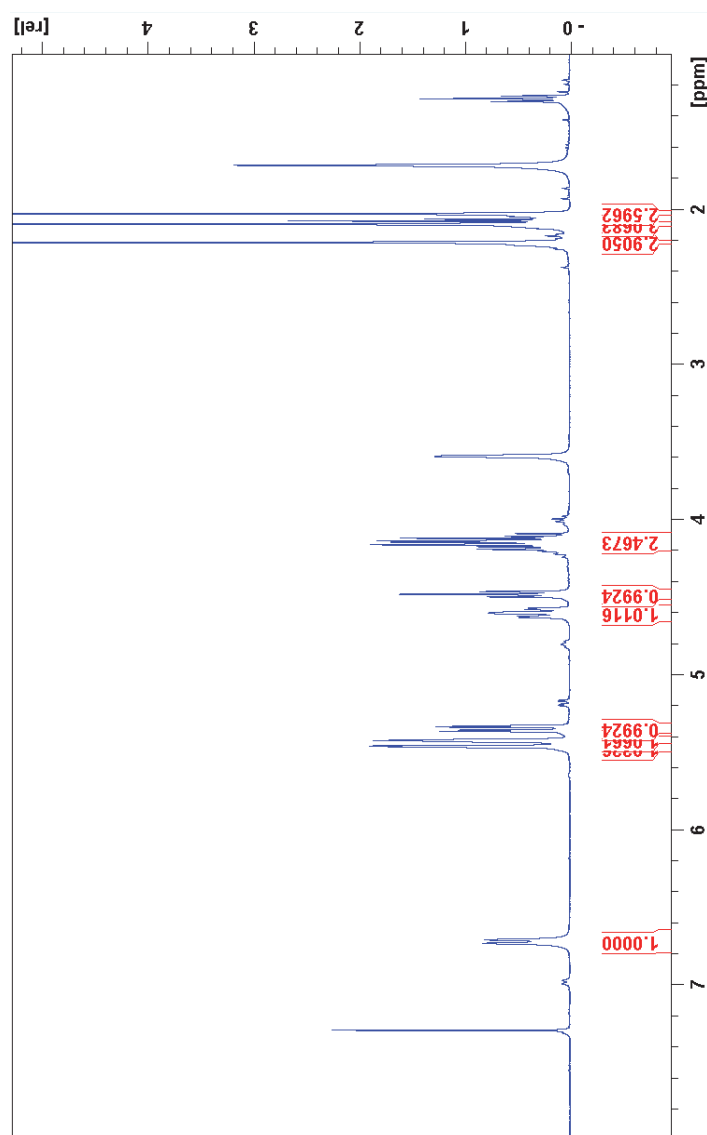
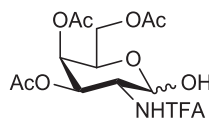
ANEXO I.

**ANEXO DE ESPECTROS.**

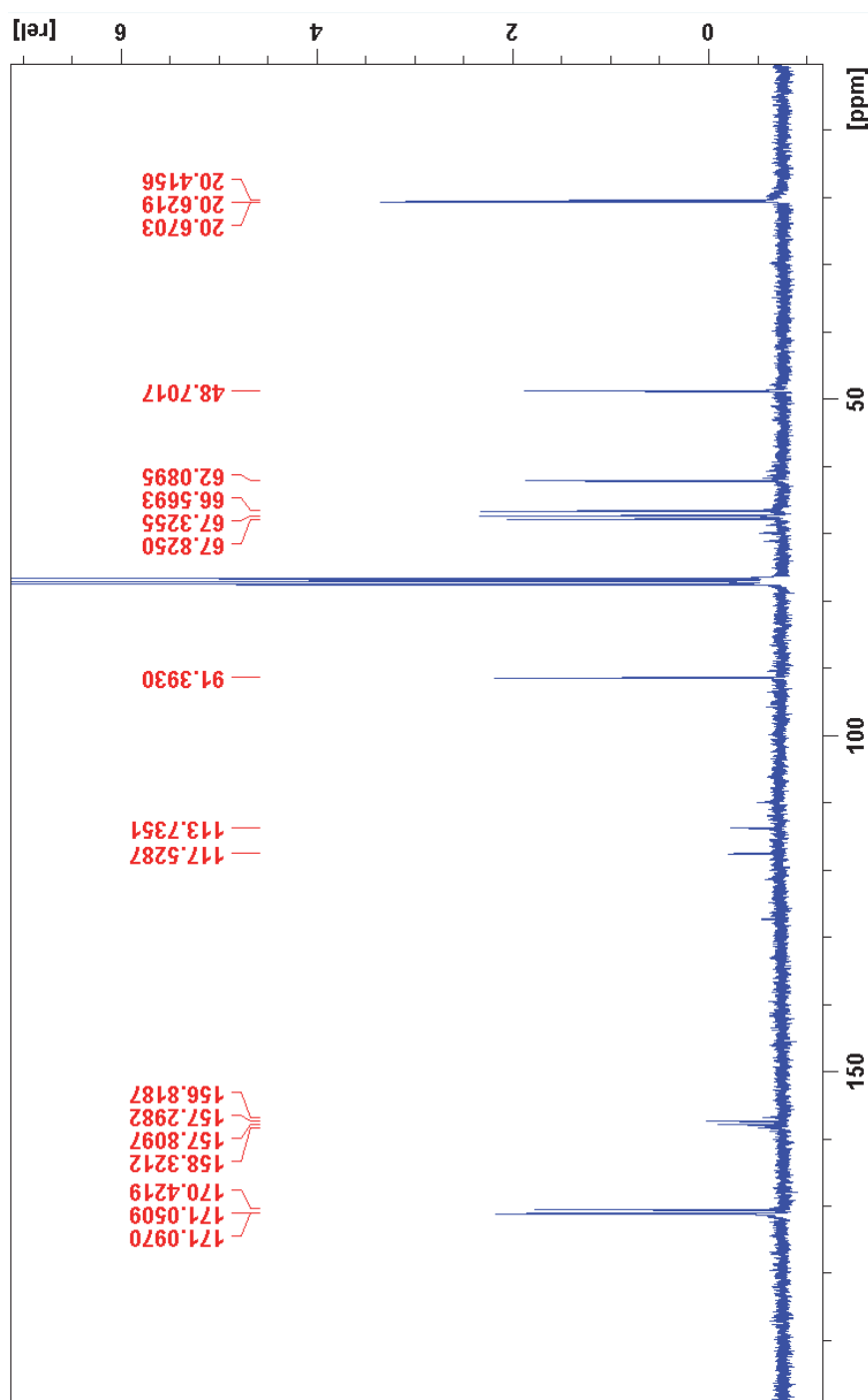


## Anexo de espectros

**Compuesto 7** ( $^1\text{H}$ -RMN, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

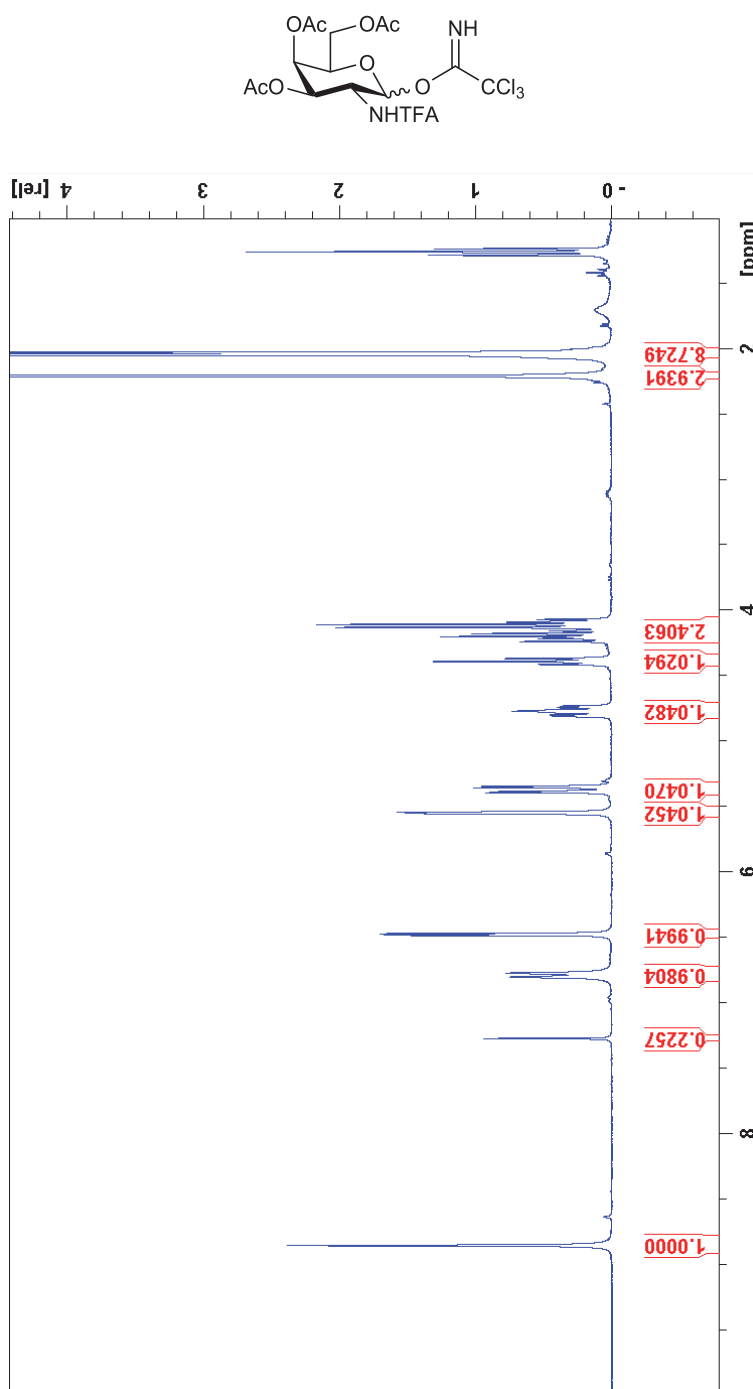


( $^{13}\text{C}$ -RMN, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

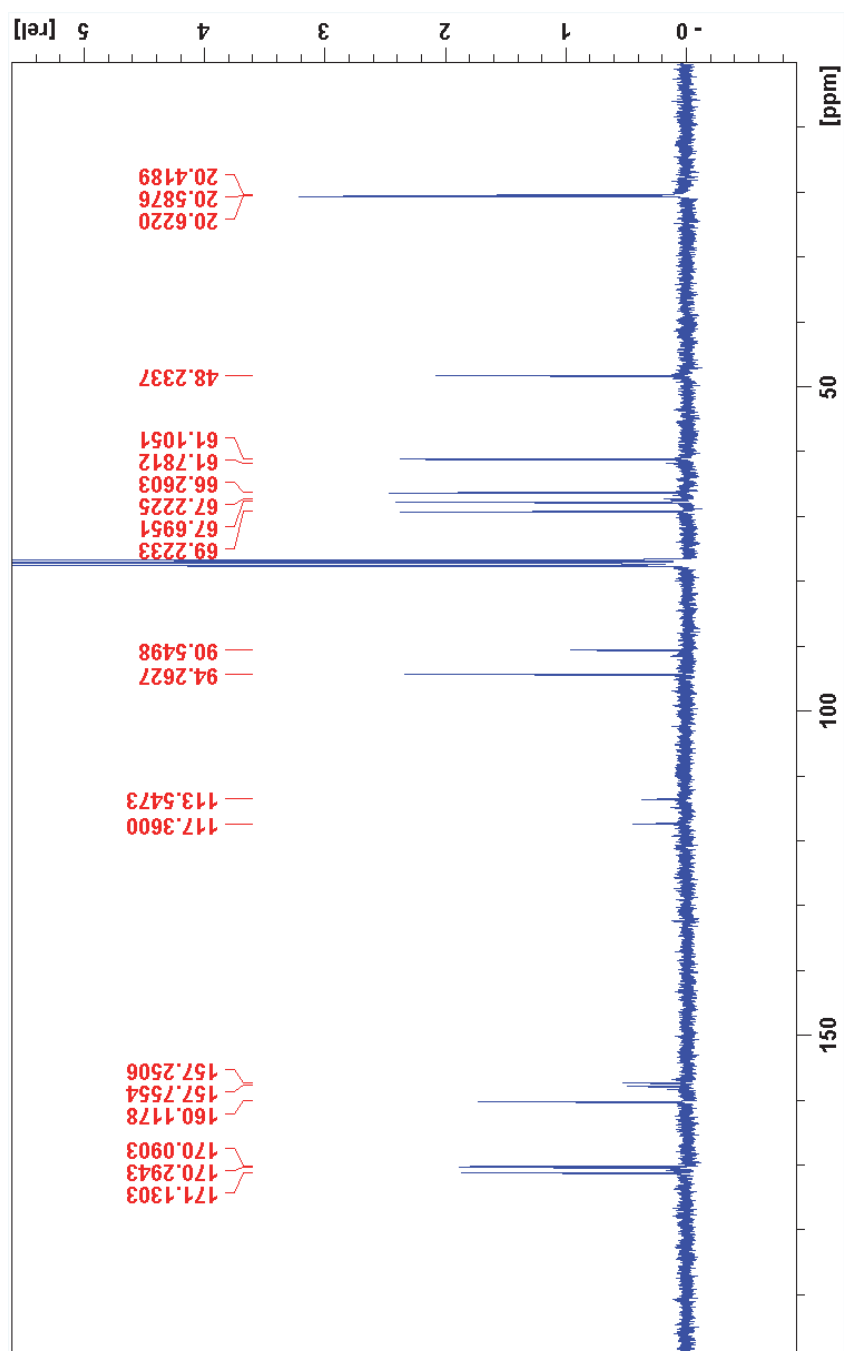




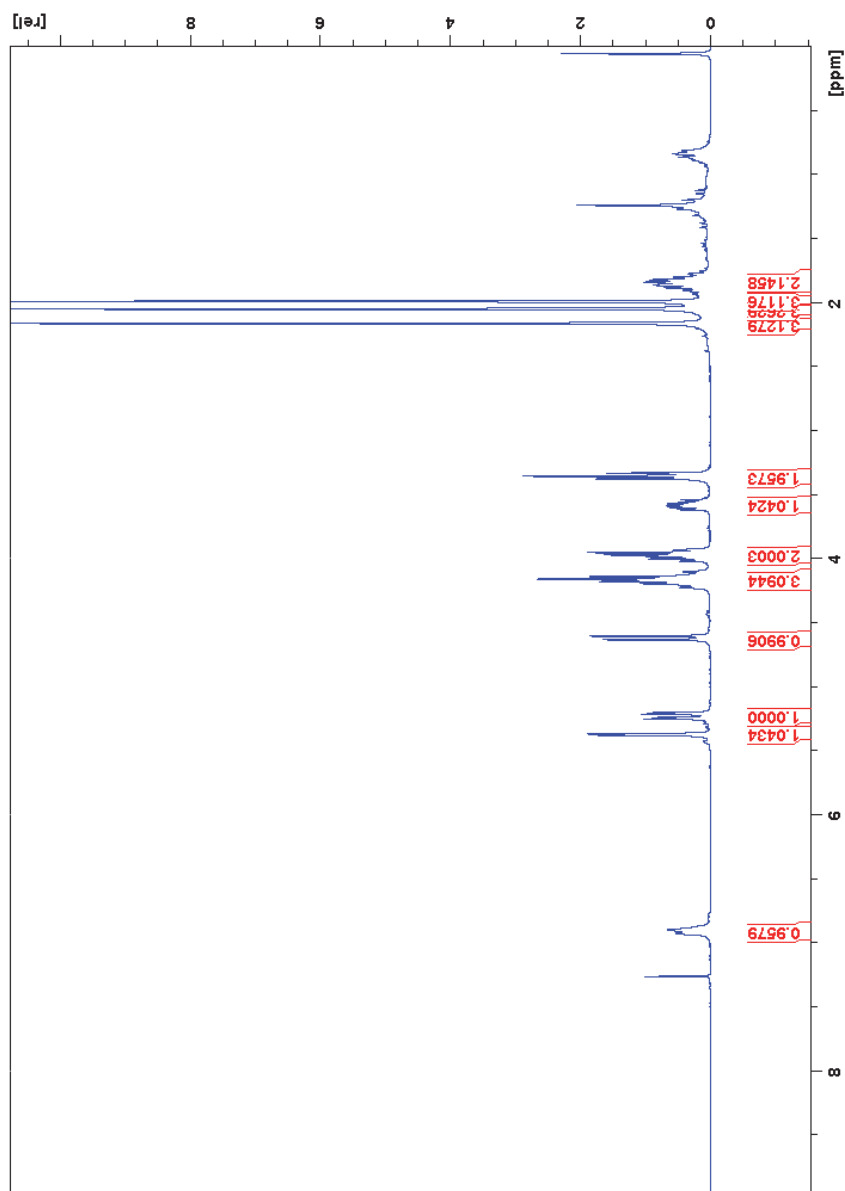
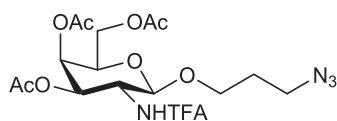
Compuesto 8 ( $^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



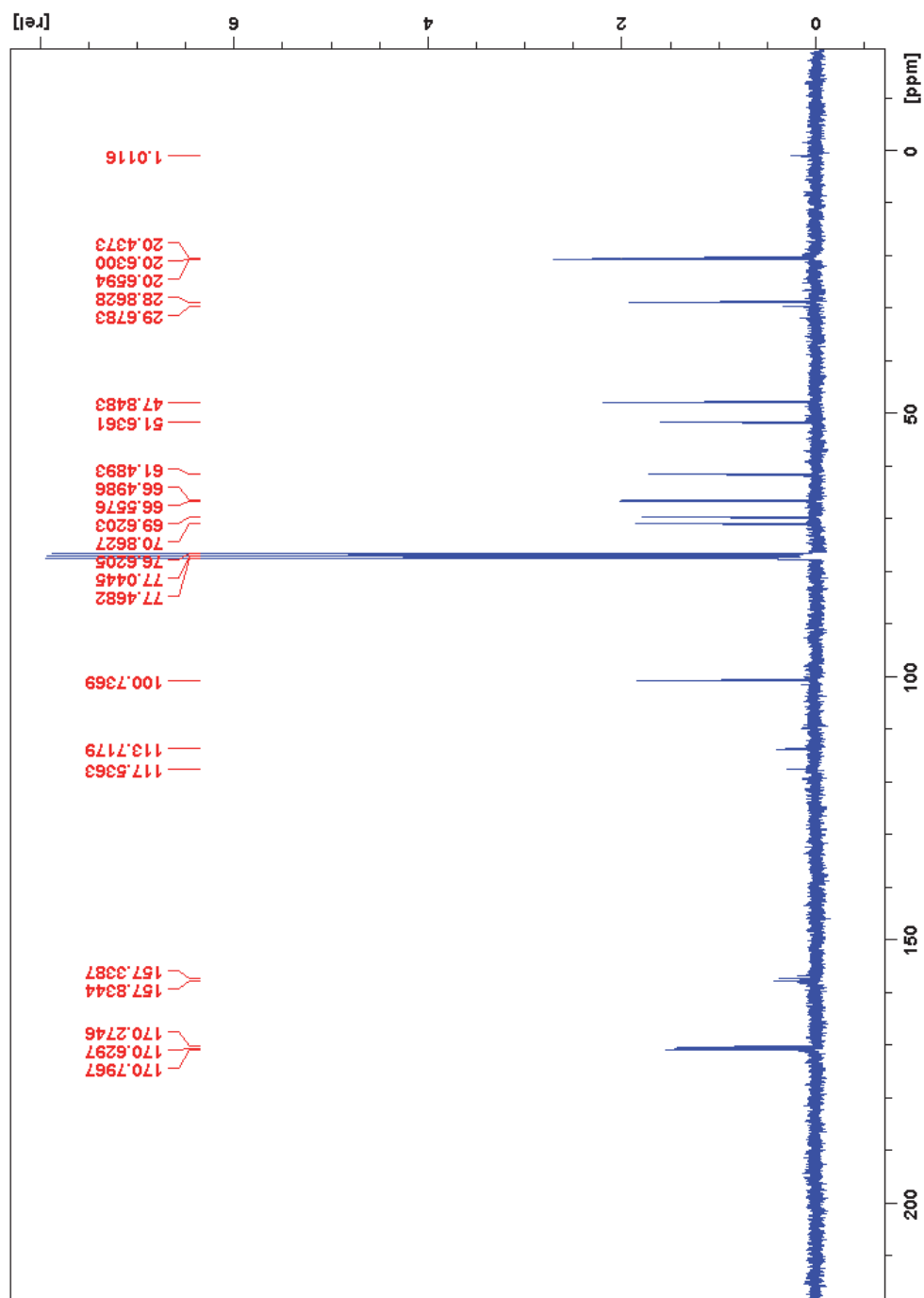
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



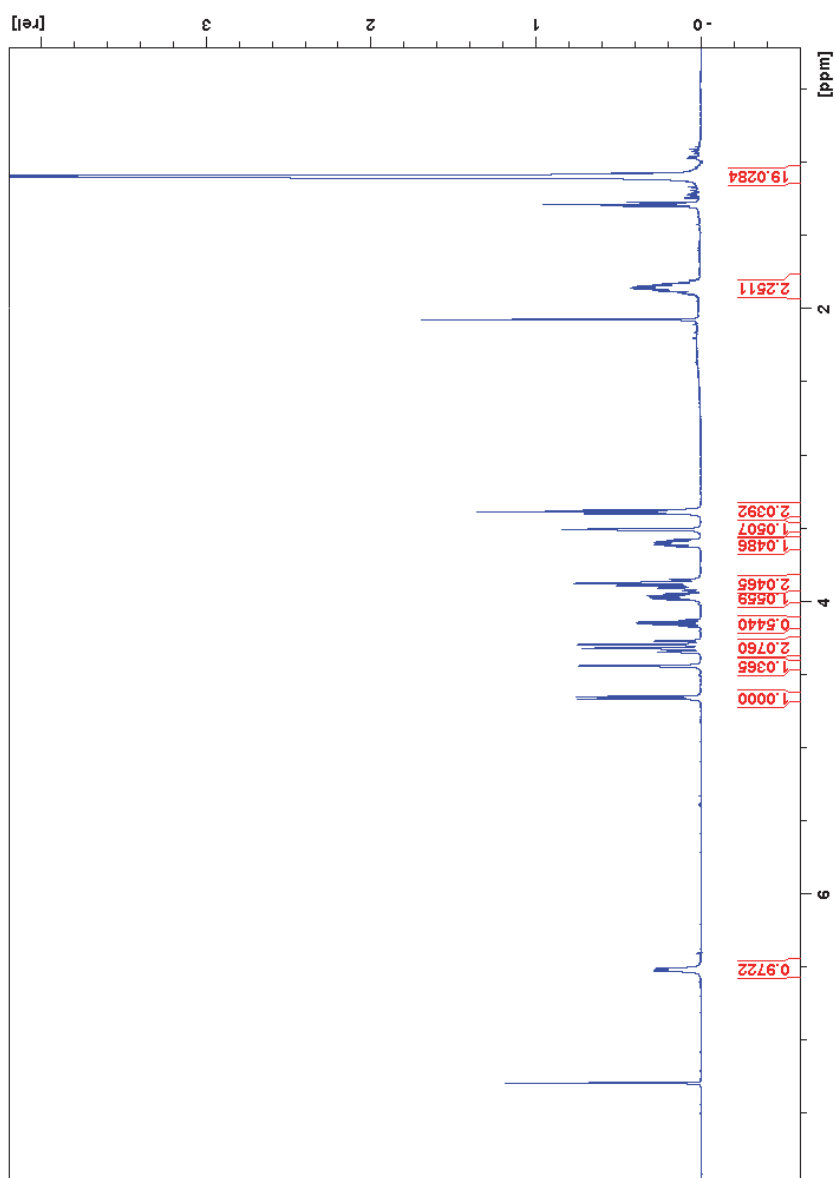
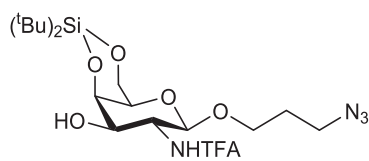
Compuesto 9 ( $^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



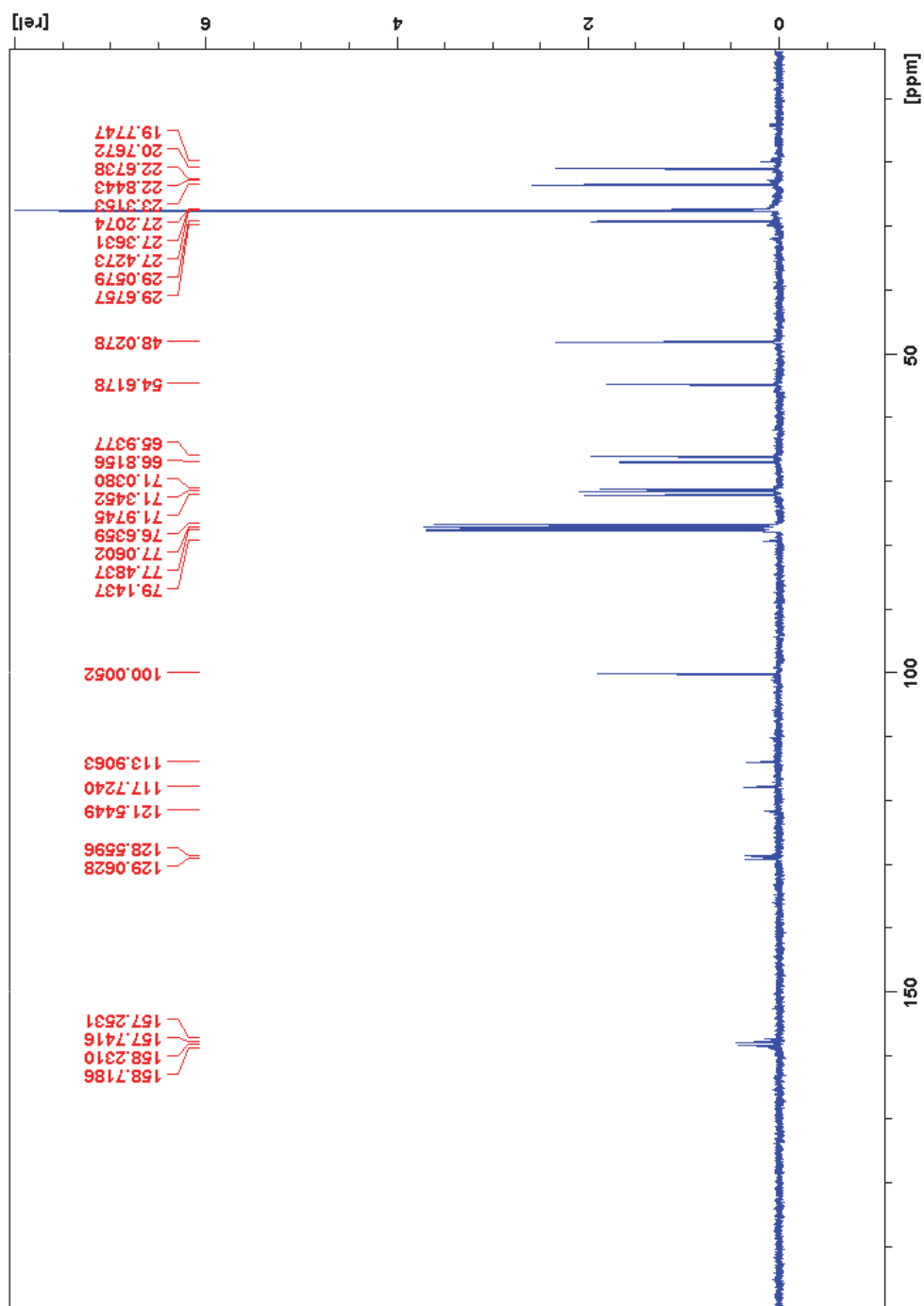
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



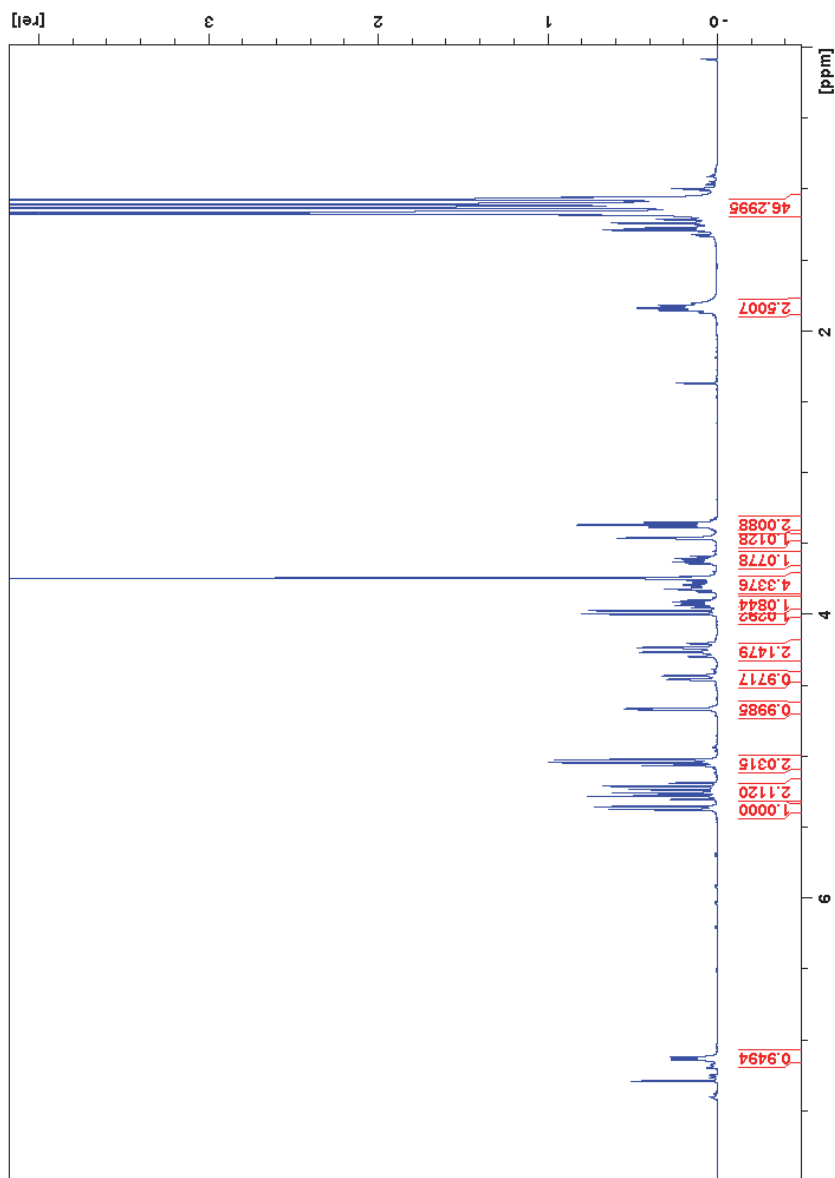
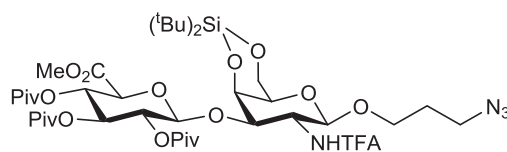
**Compuesto 4** ( $^1\text{H}$ -RMN, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



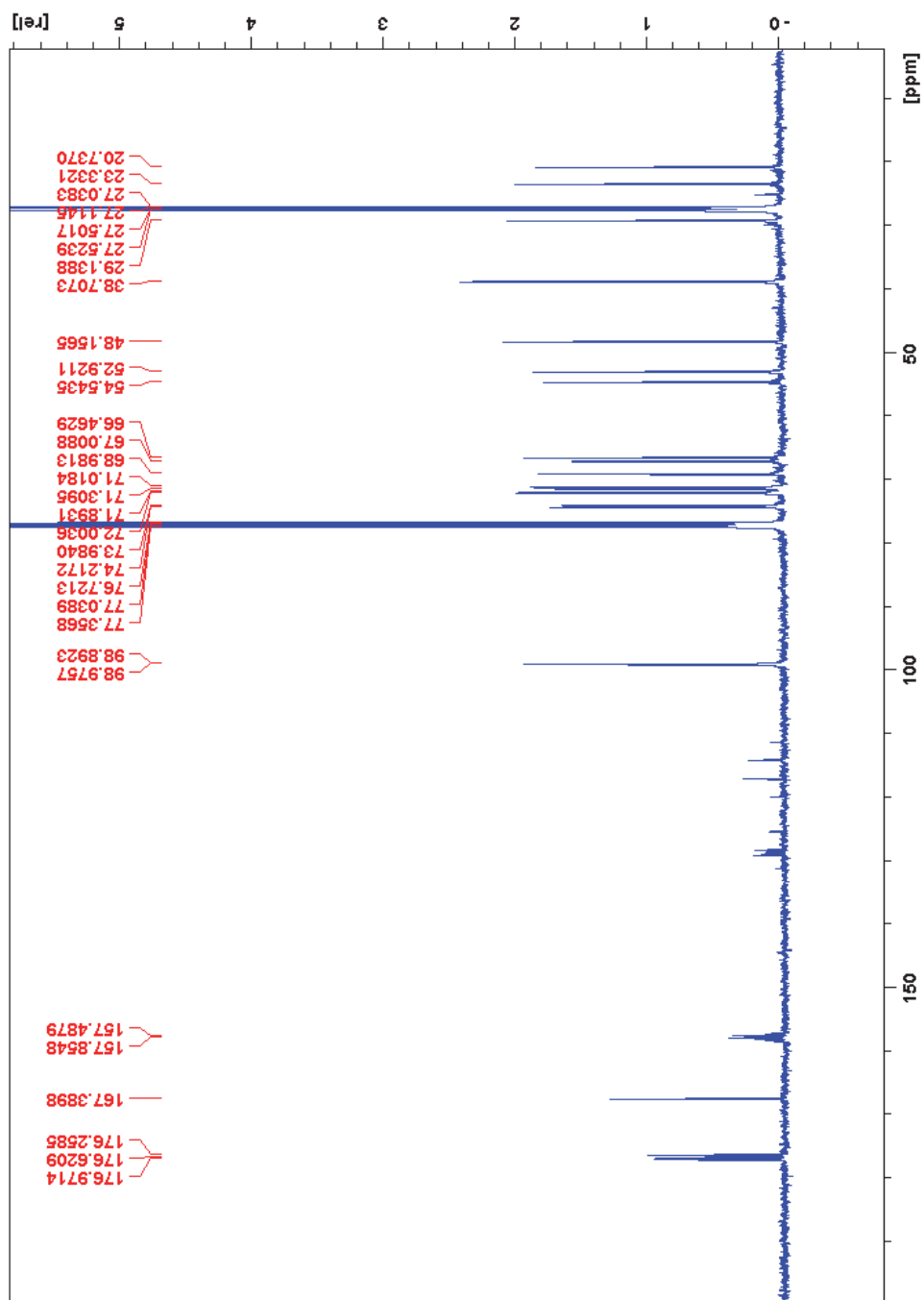
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Compuesto 13** ( $^1\text{H}$ -RMN, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

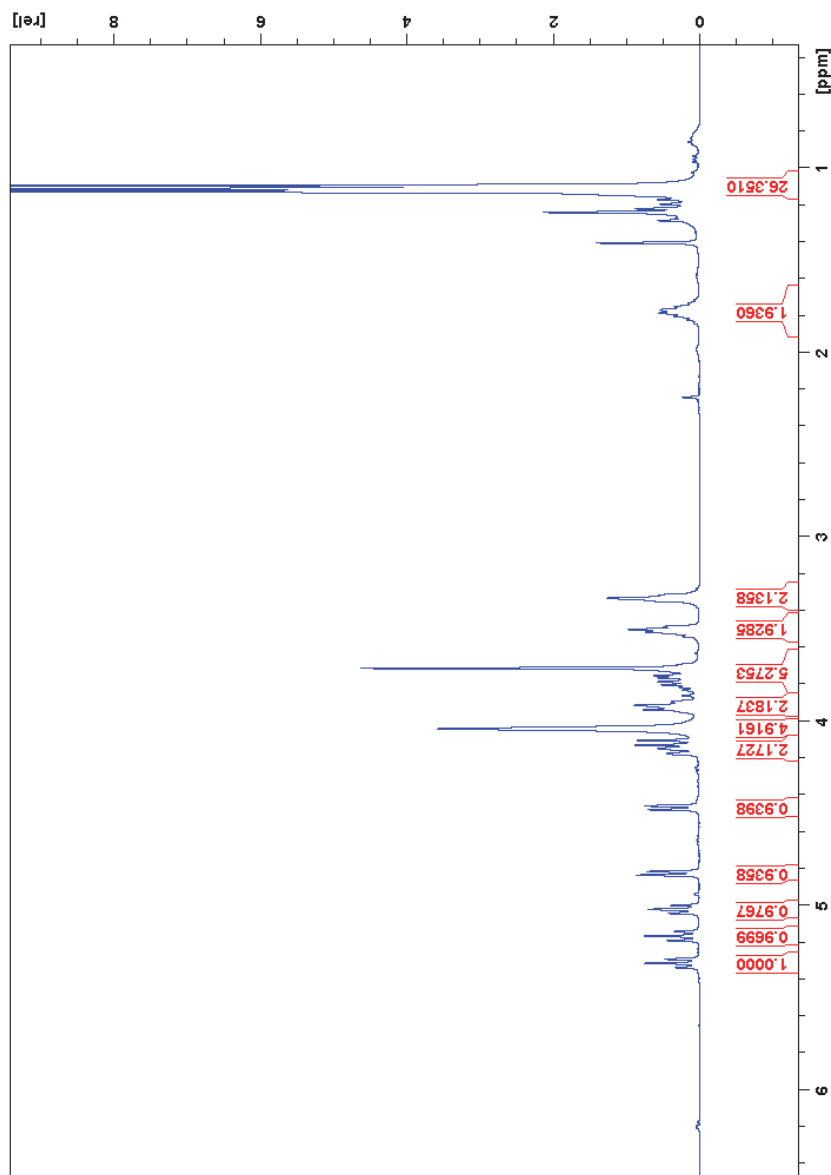
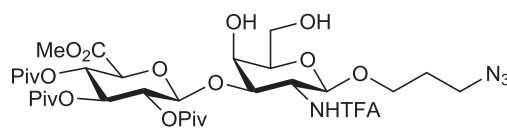


( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

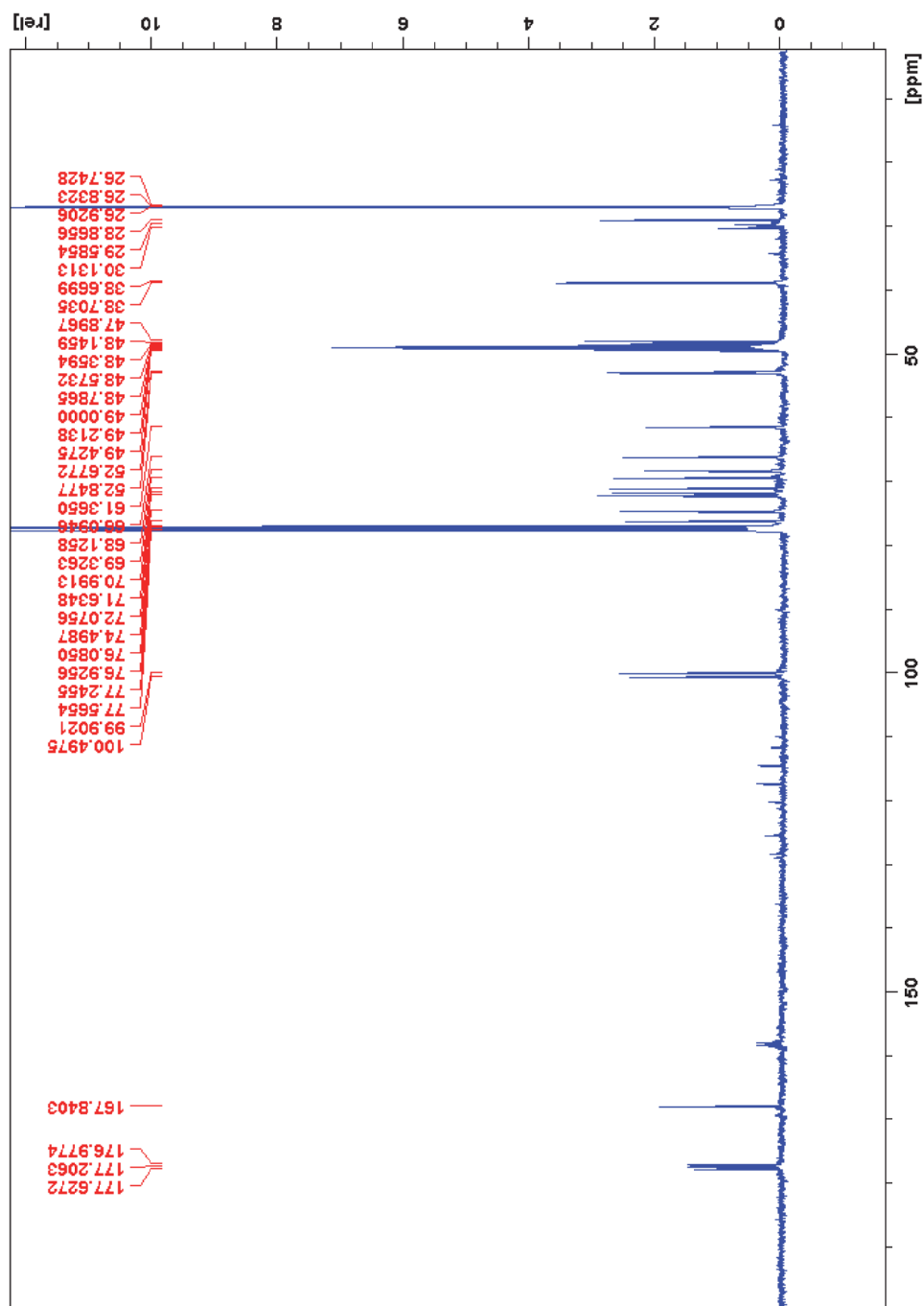




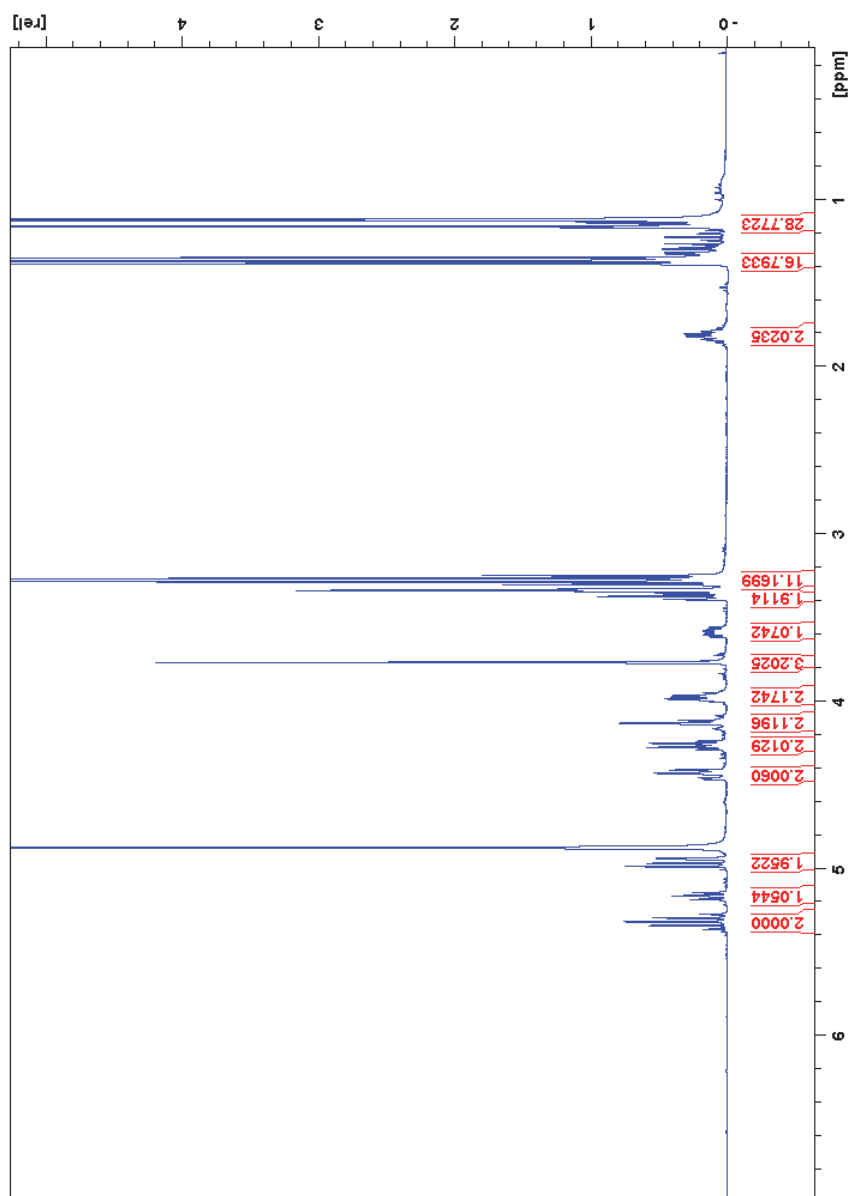
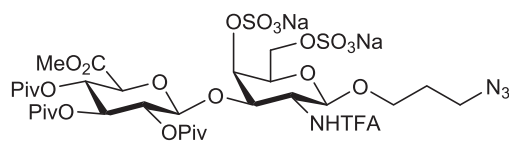
**Compuesto 14** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  5:1)



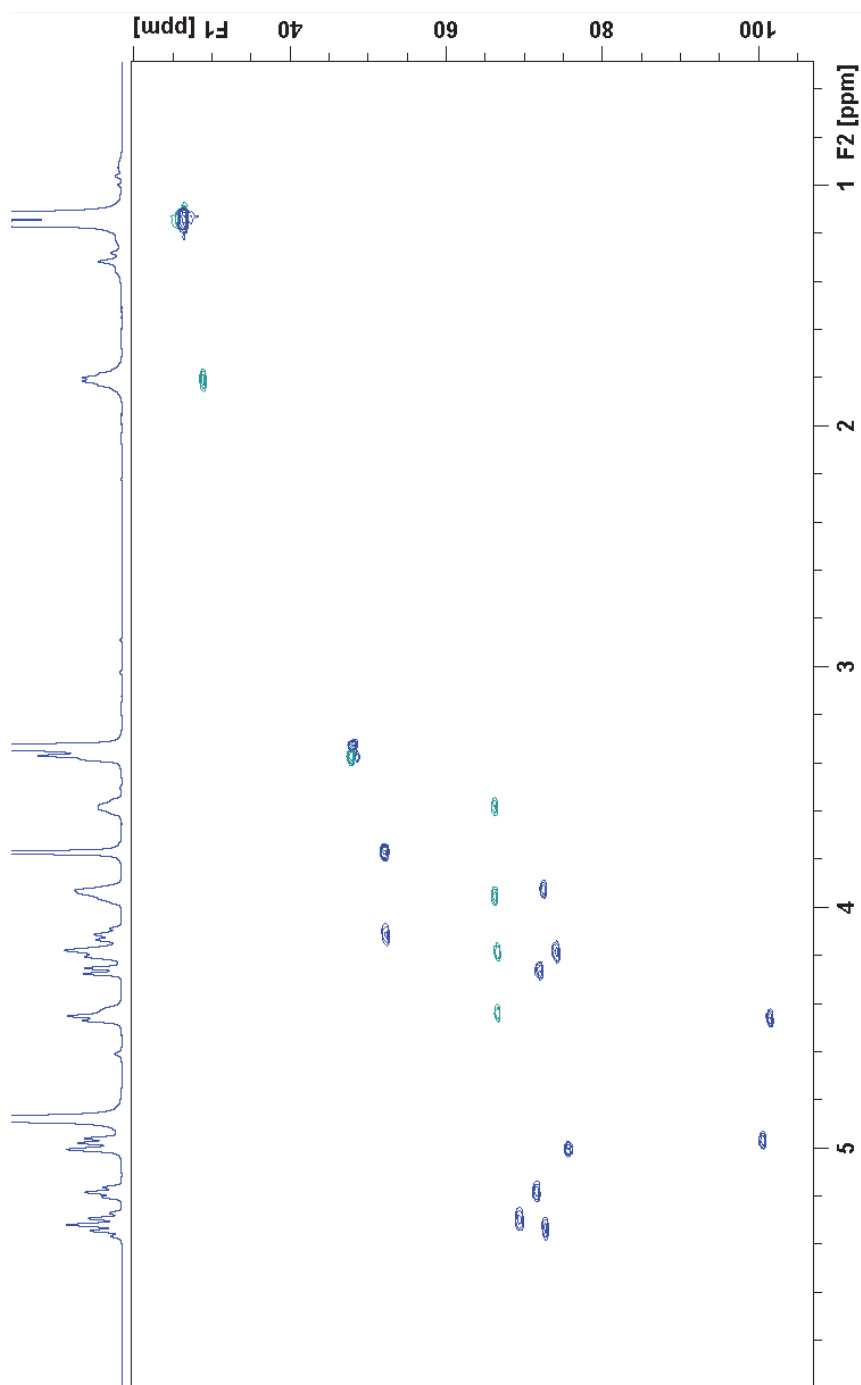
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  5:1)



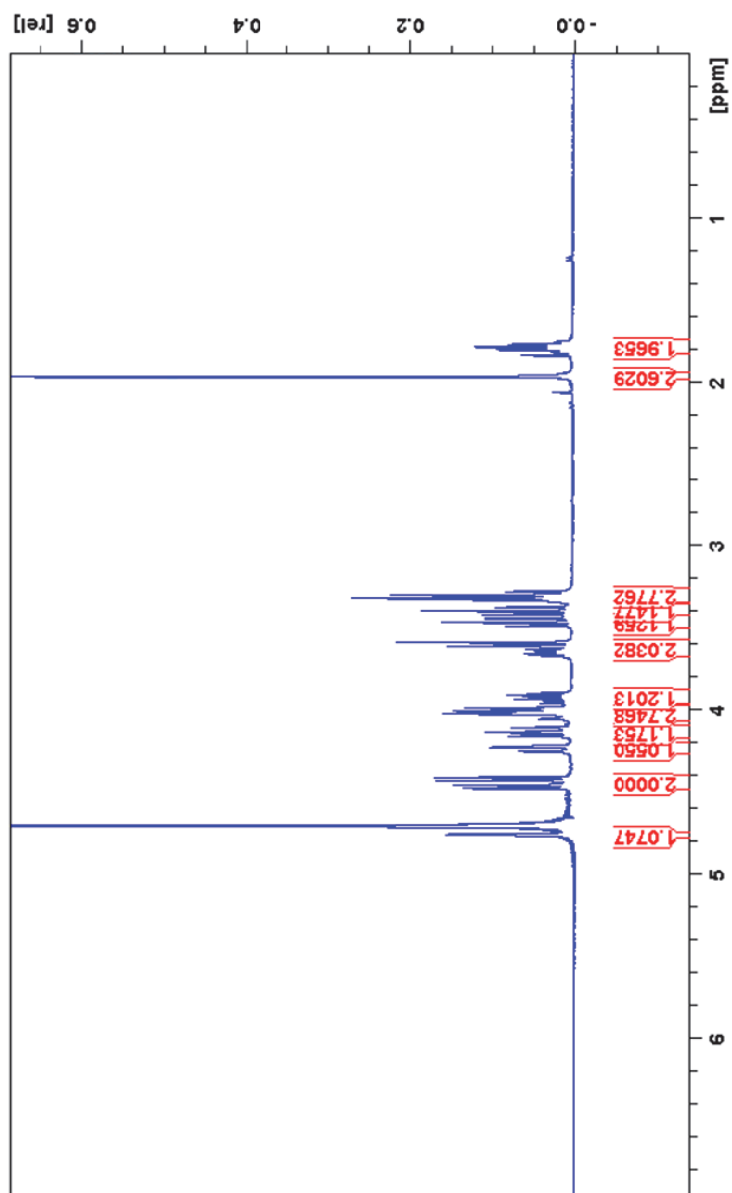
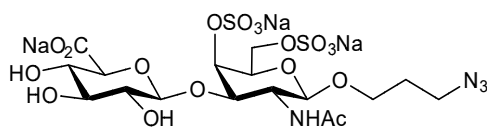
**Compuesto 2** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



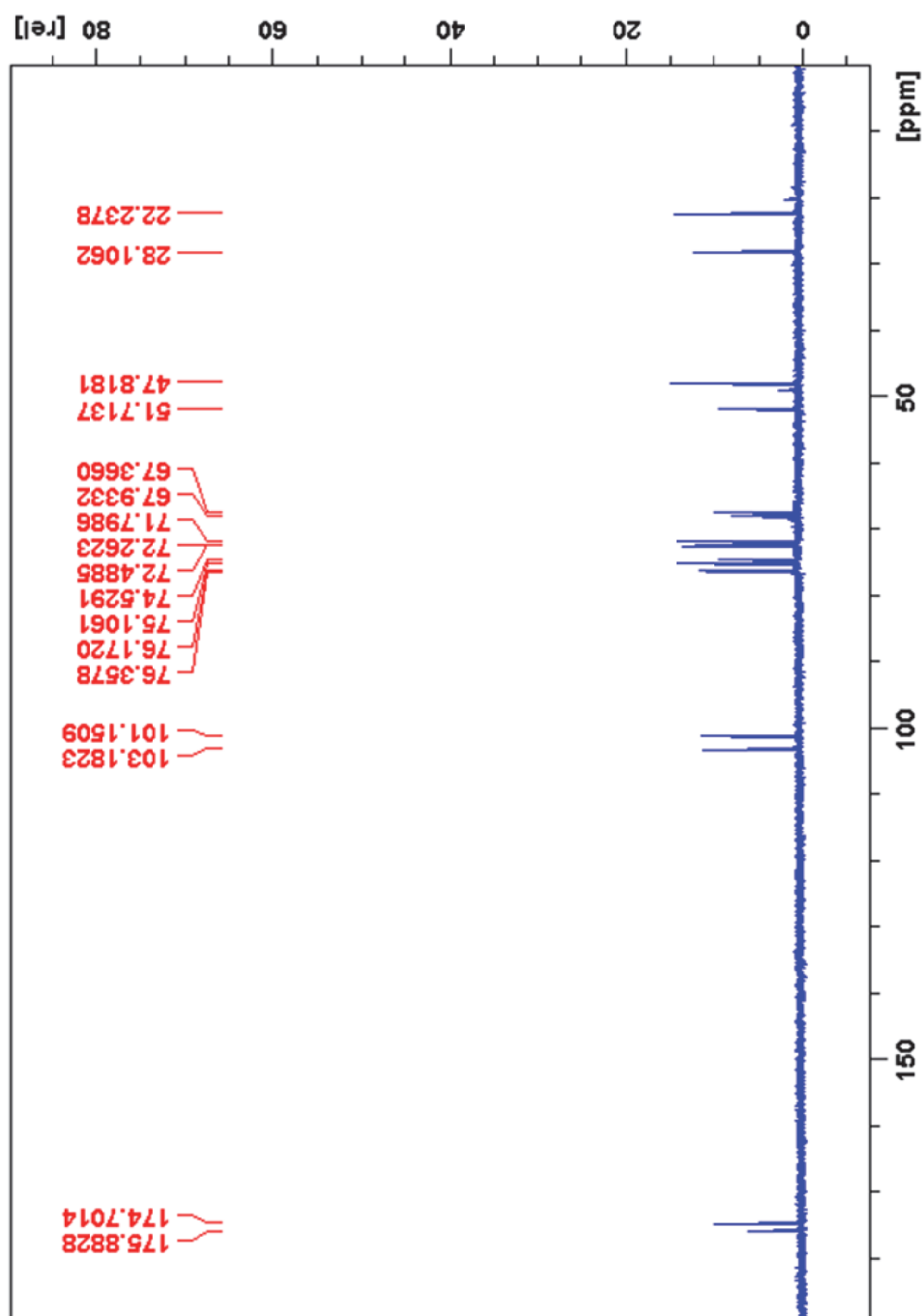
(HSQC, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



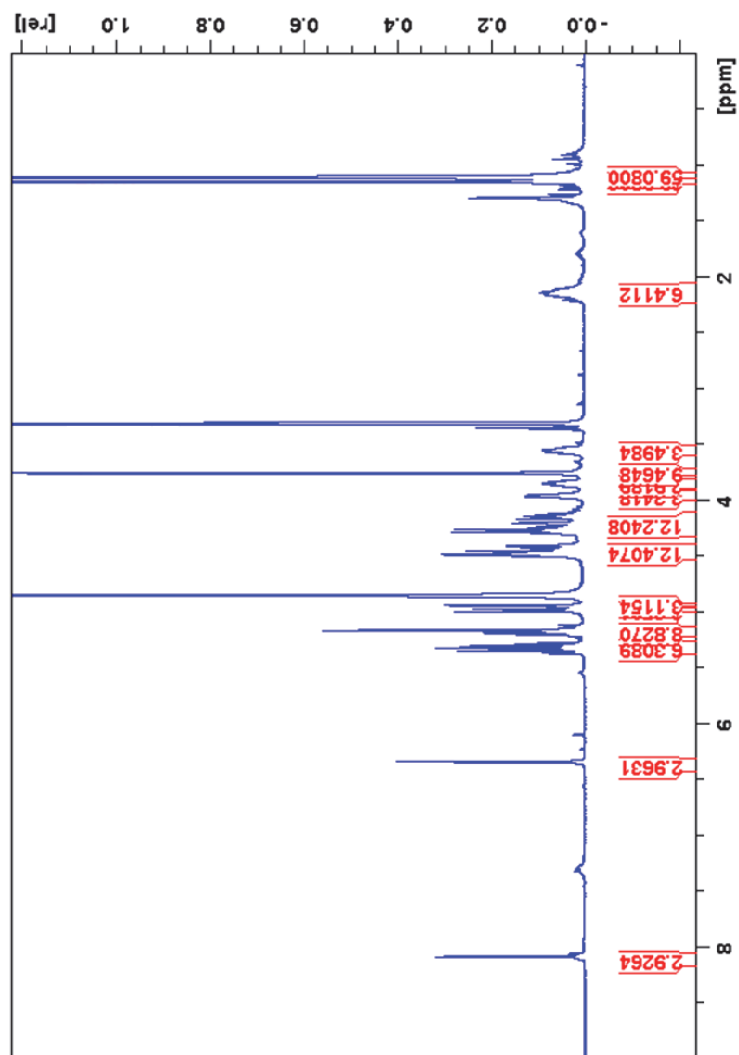
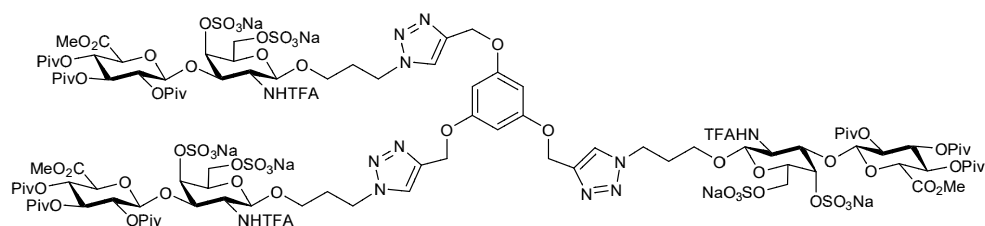
**Compuesto 1** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



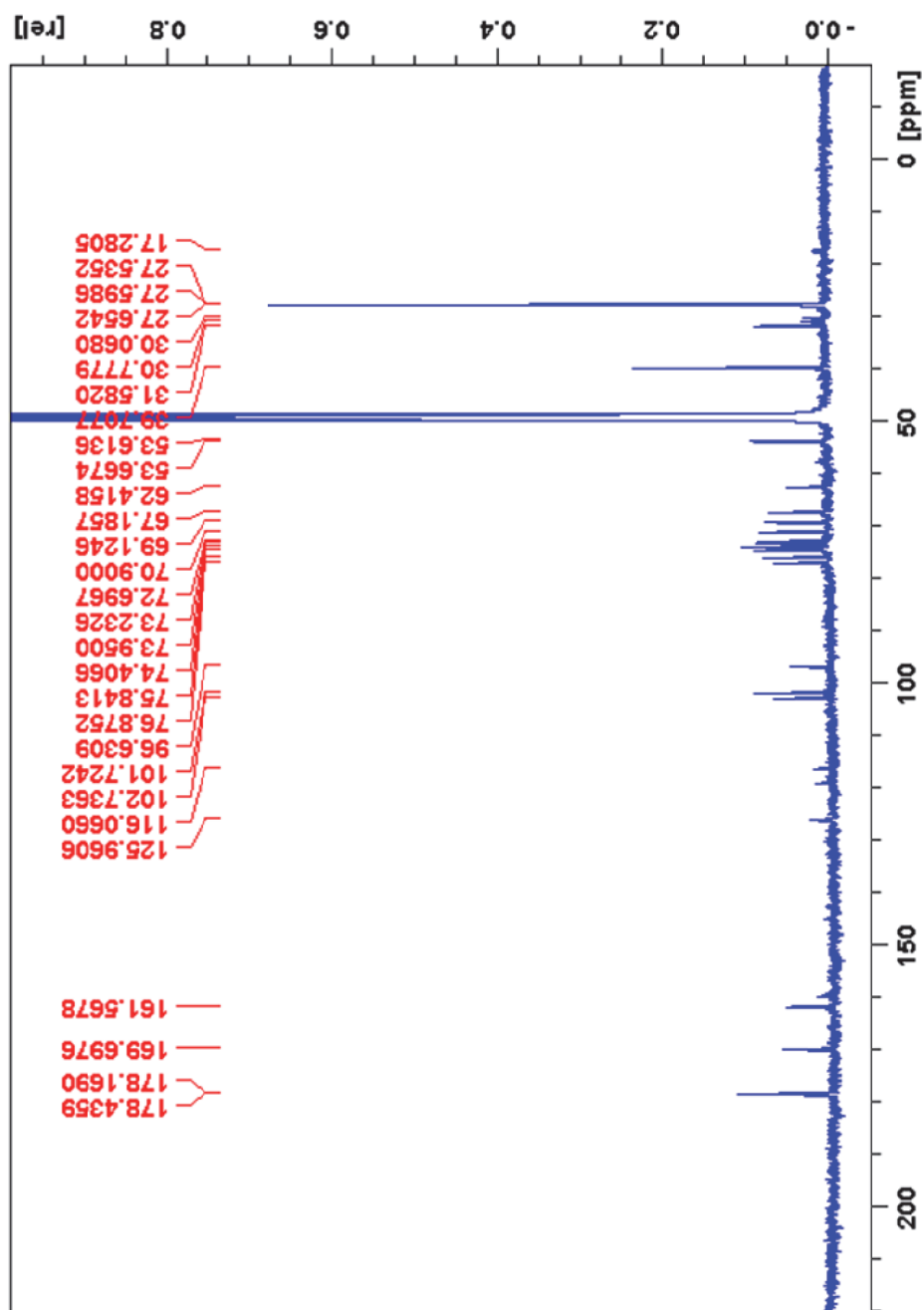
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



Dendrímero 19 (<sup>1</sup>H-RMN, 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

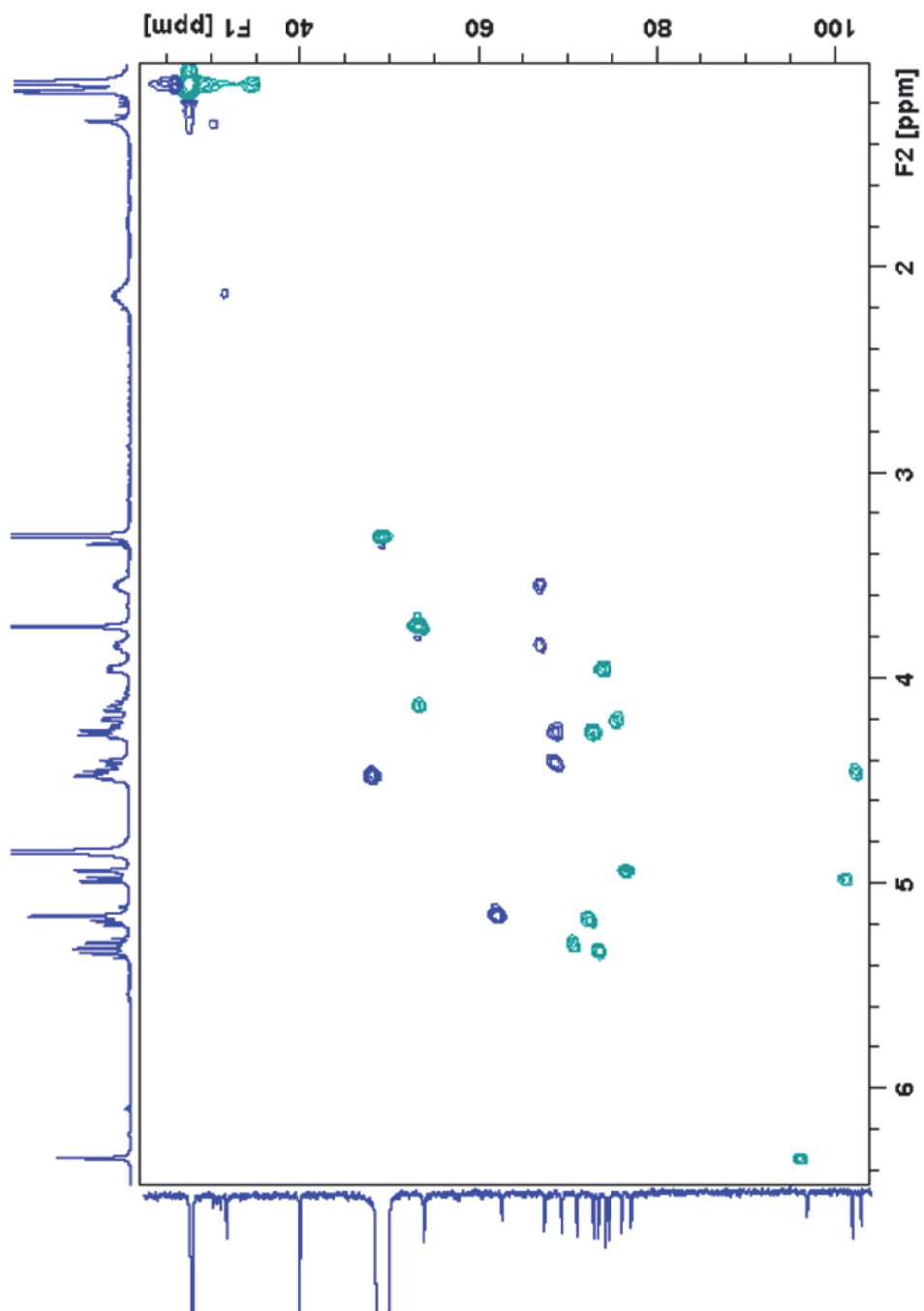


( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

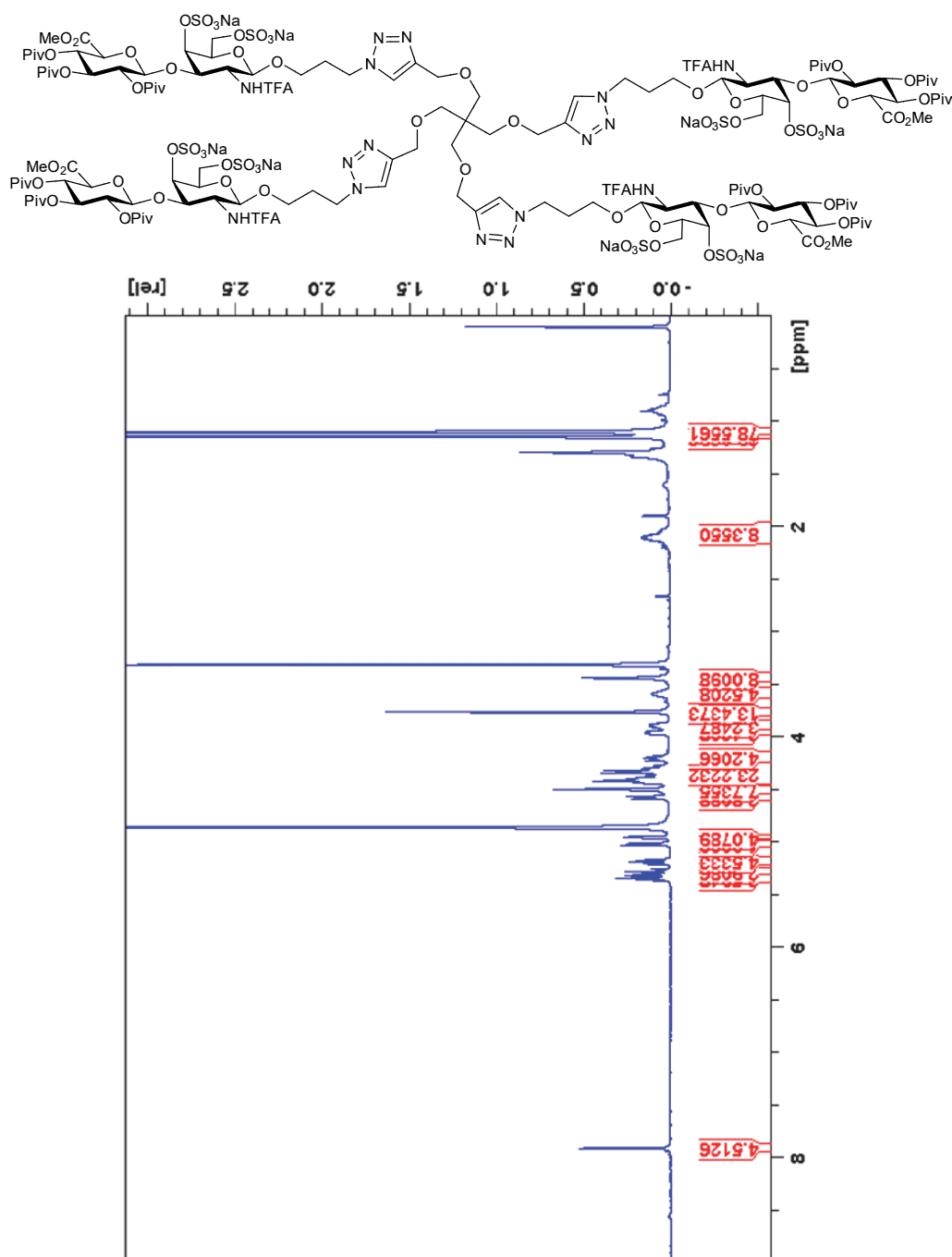




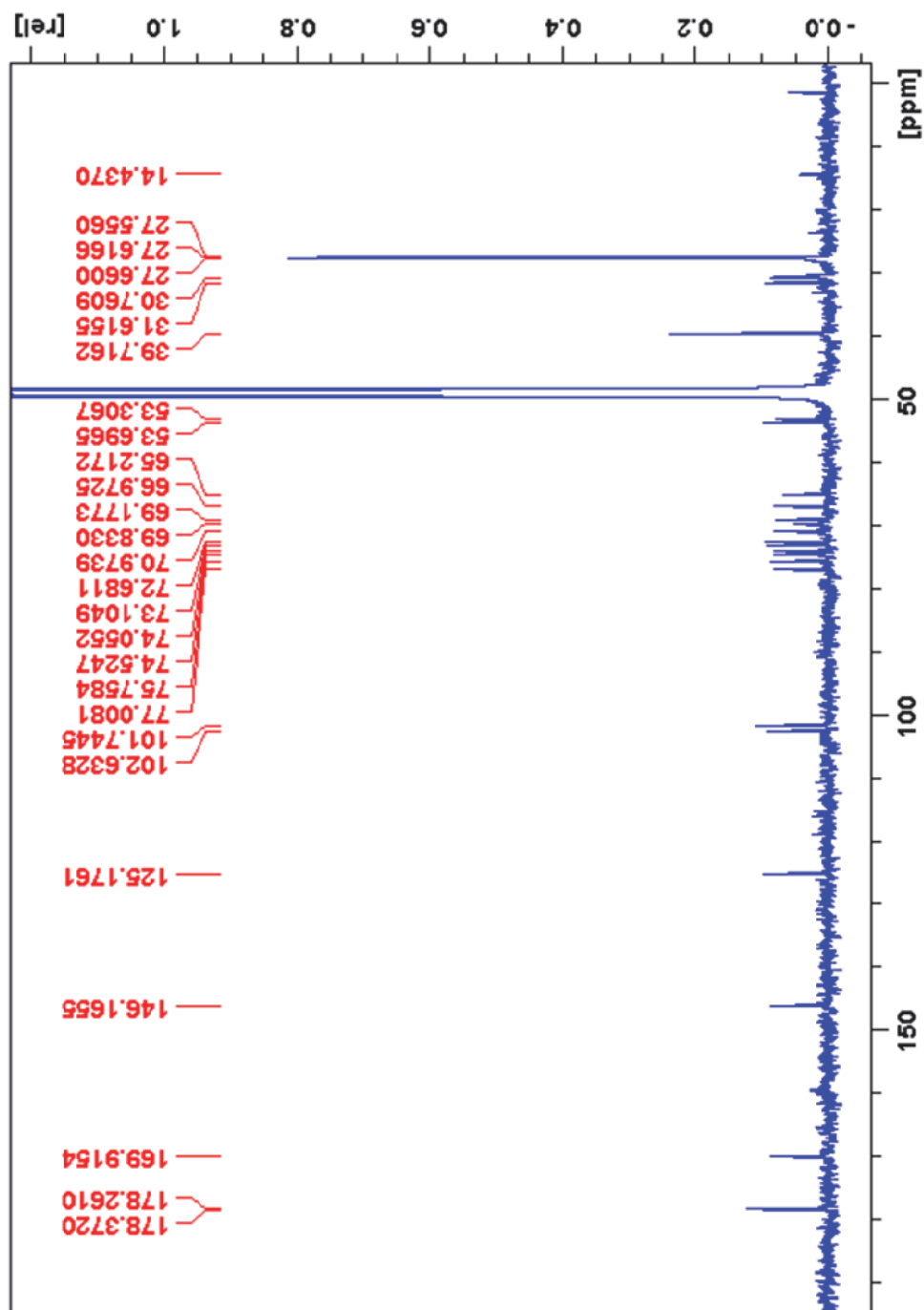
(HSQC, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



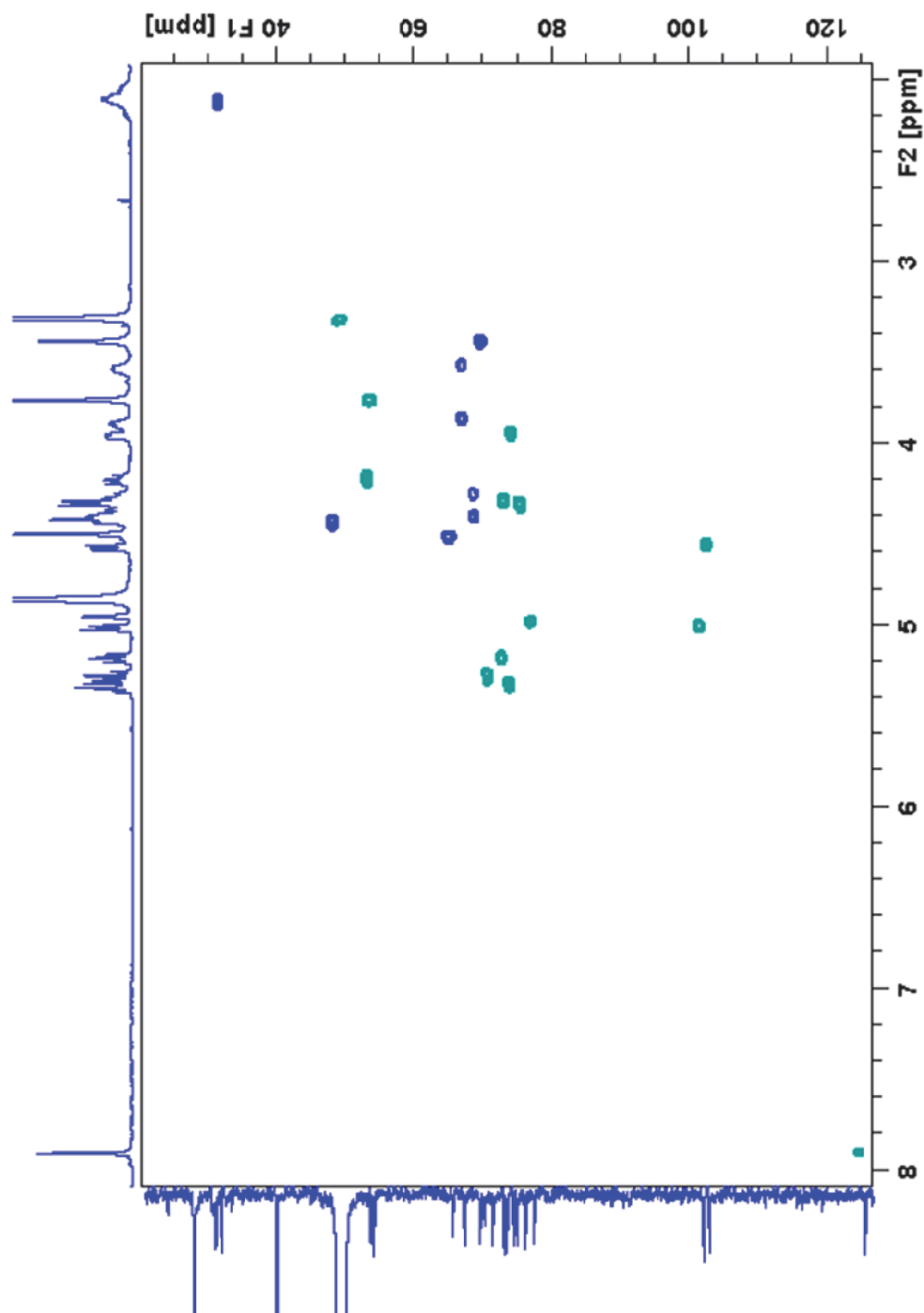
Dendrímero 20 ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



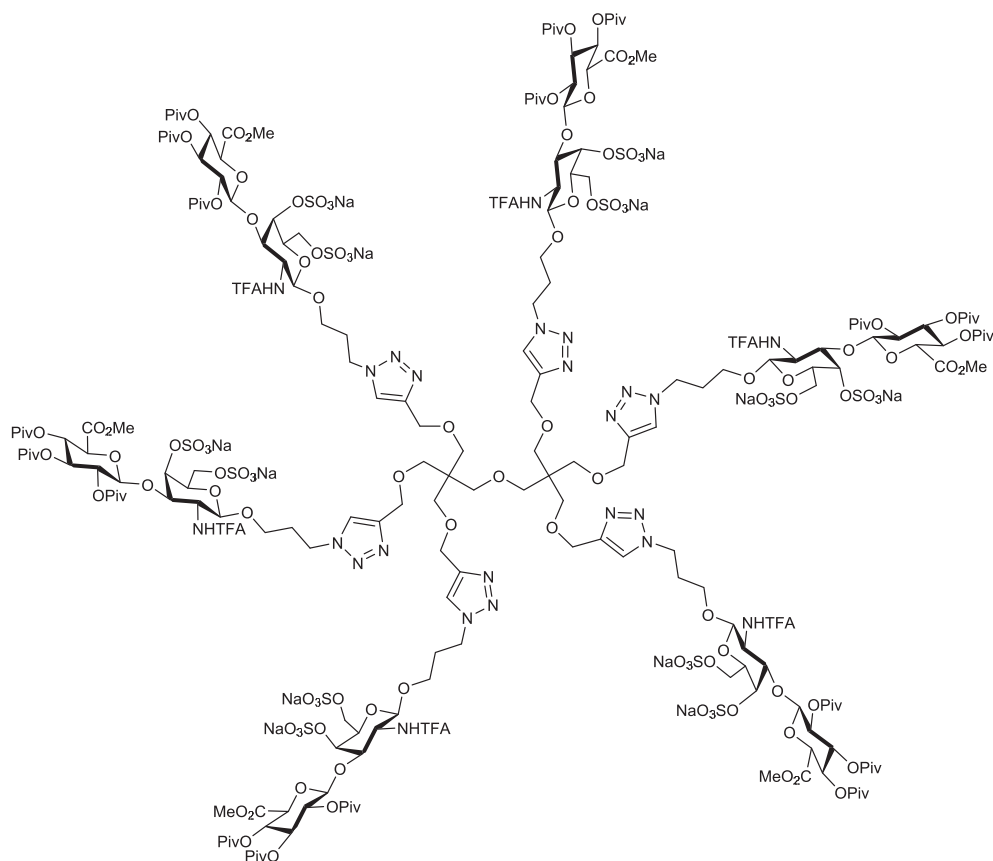
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

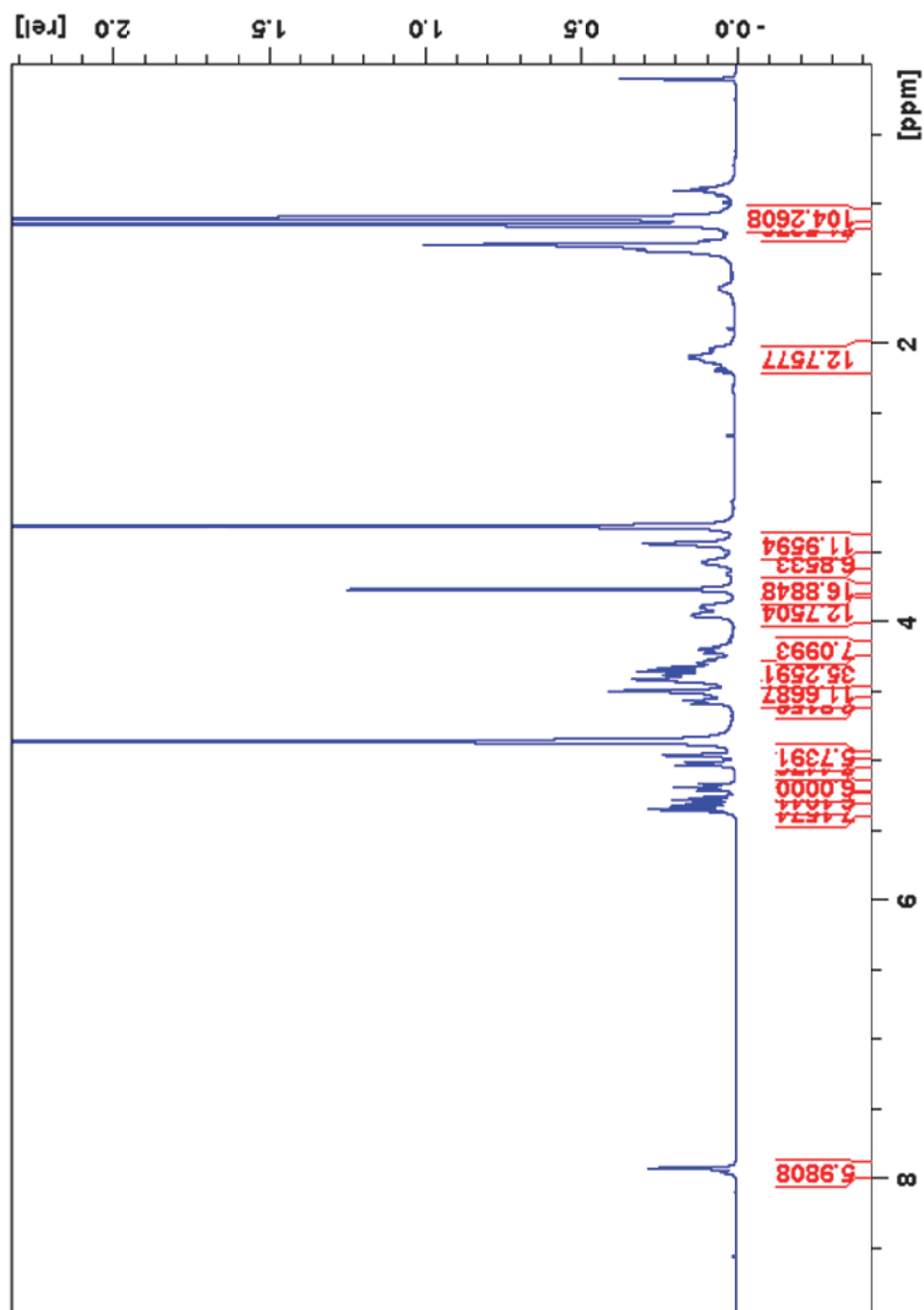


(HSQC, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

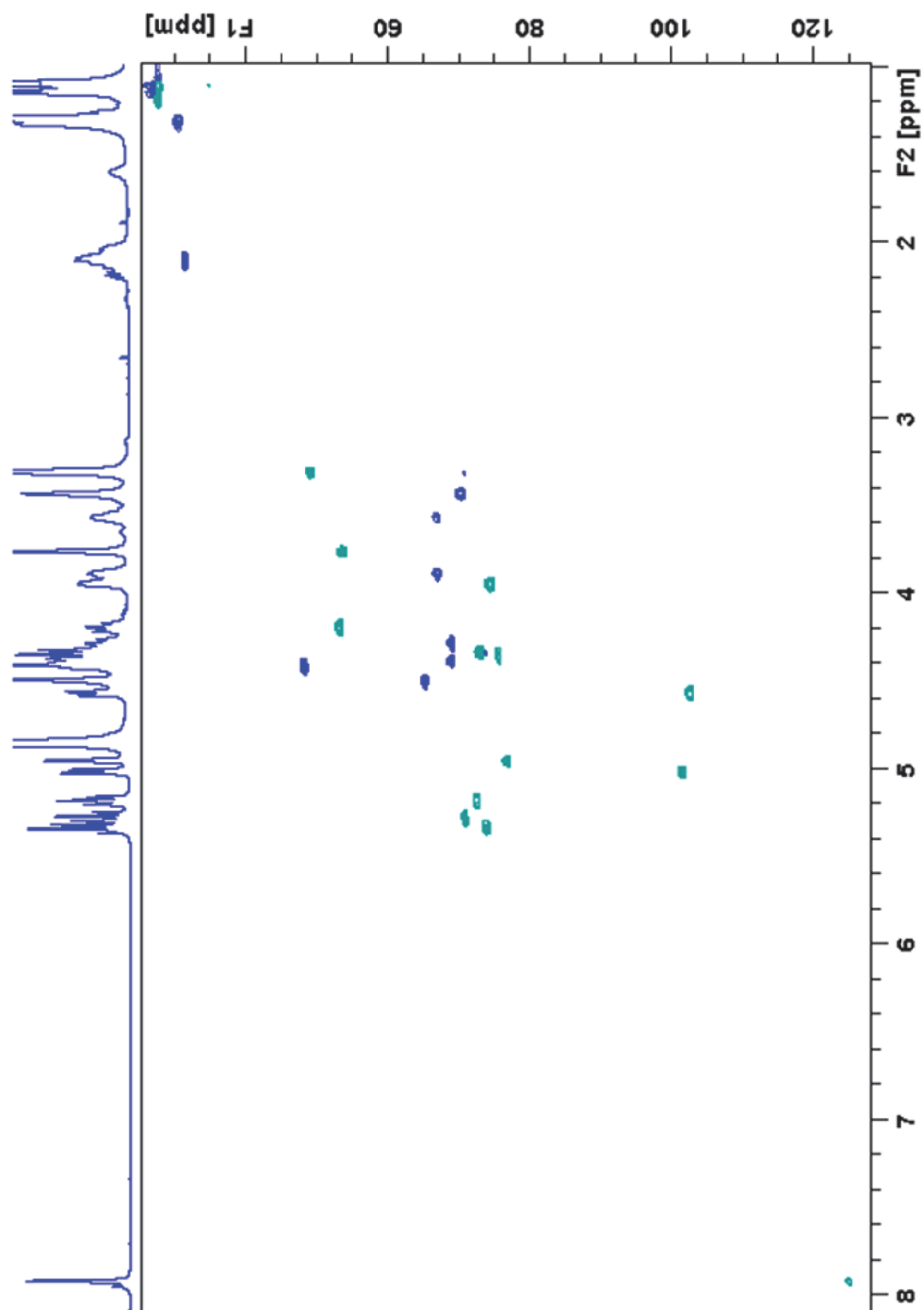


Dendrímero 21 ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

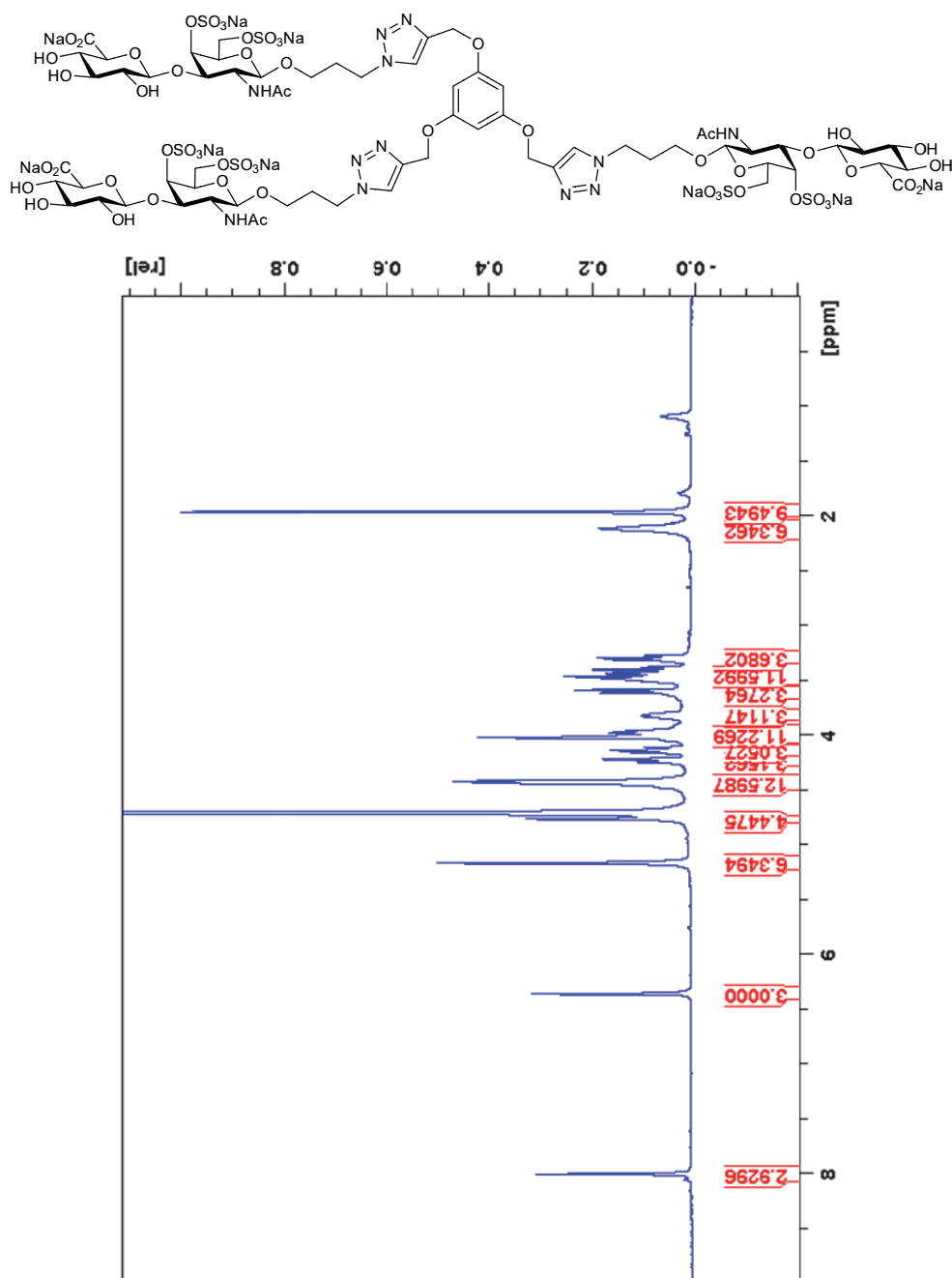




(HSQC, 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

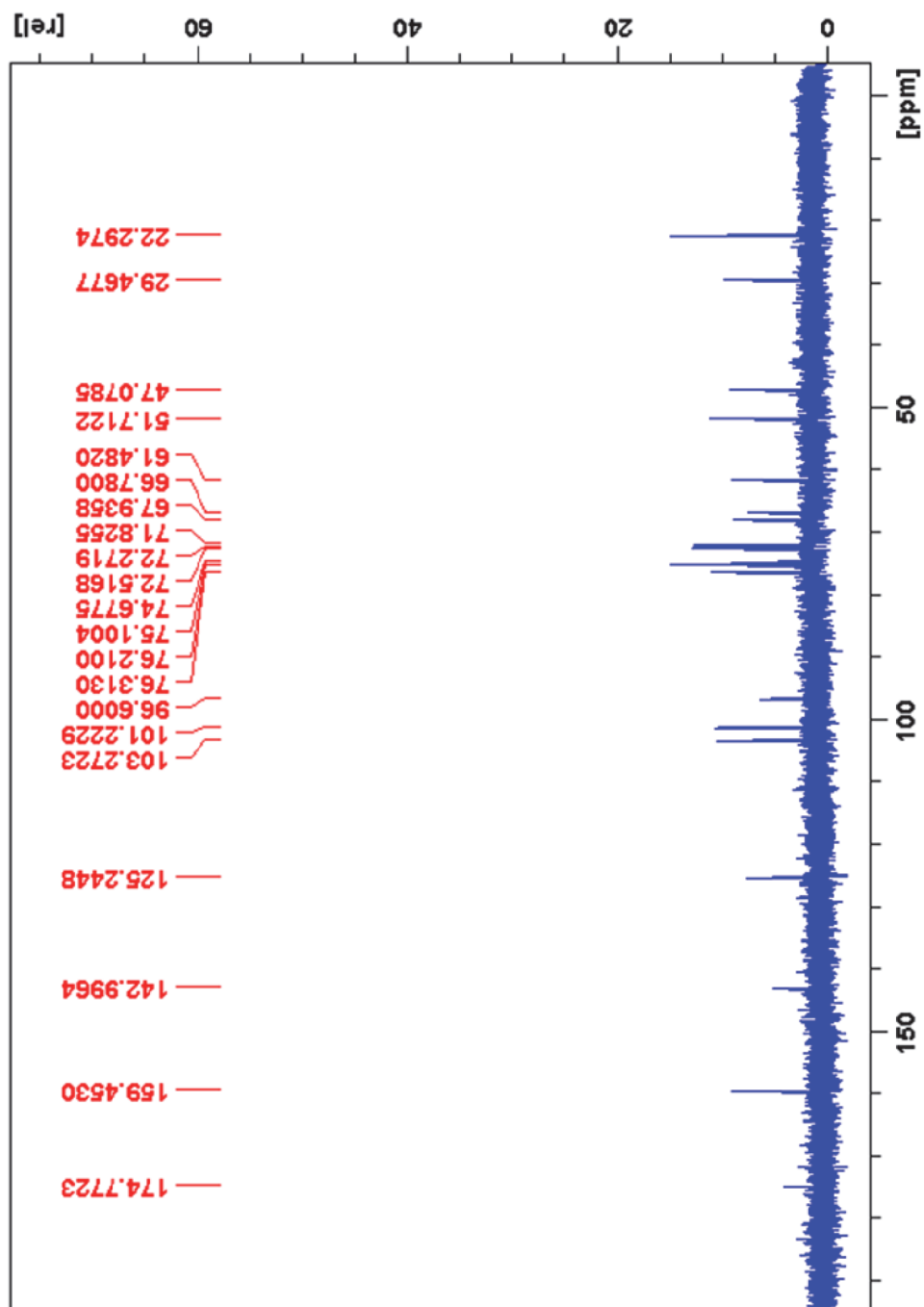


Dendrímero 22 ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

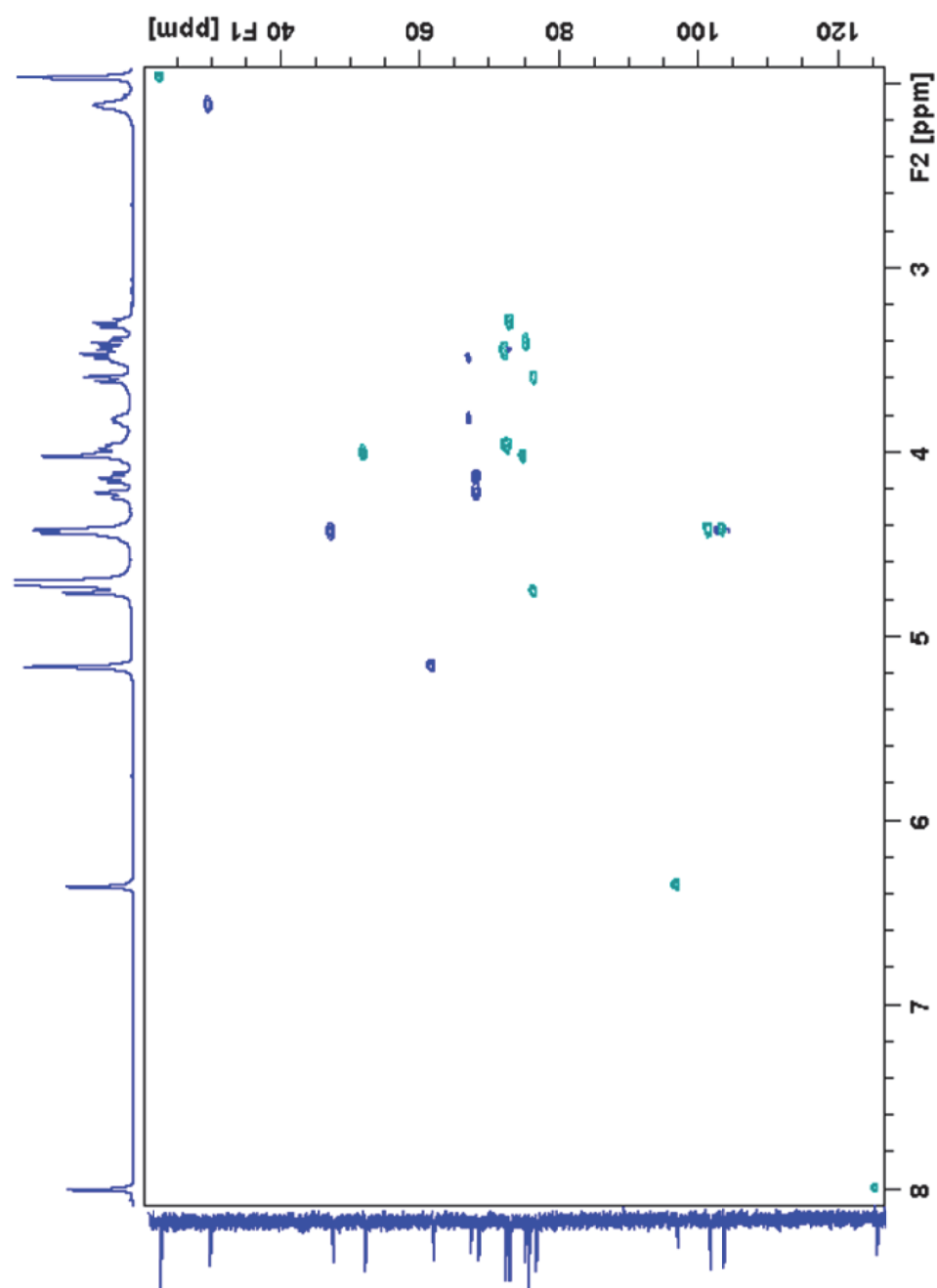




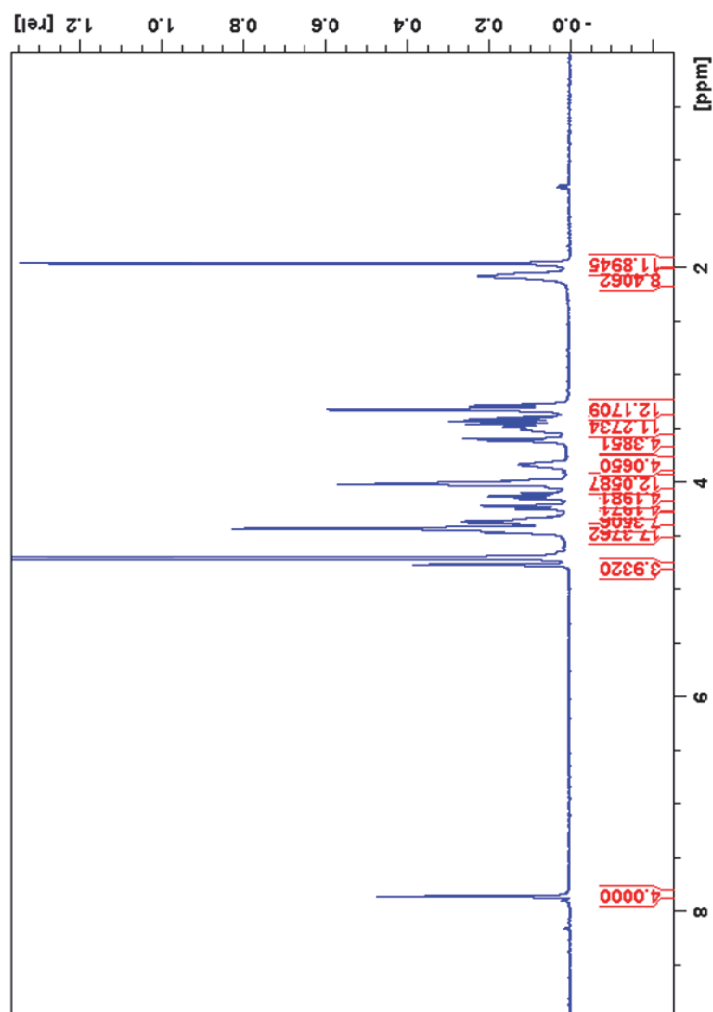
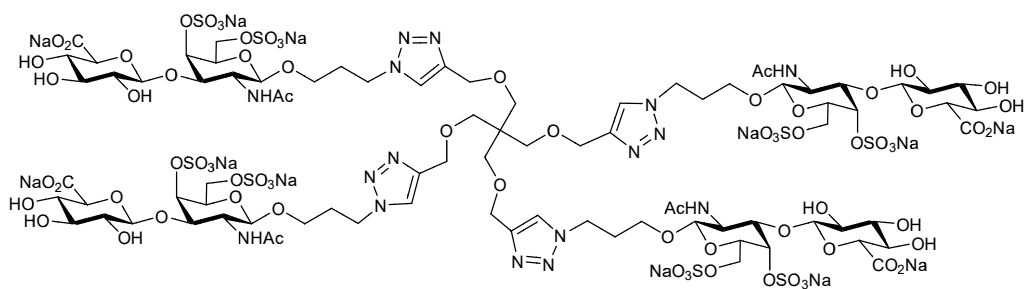
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



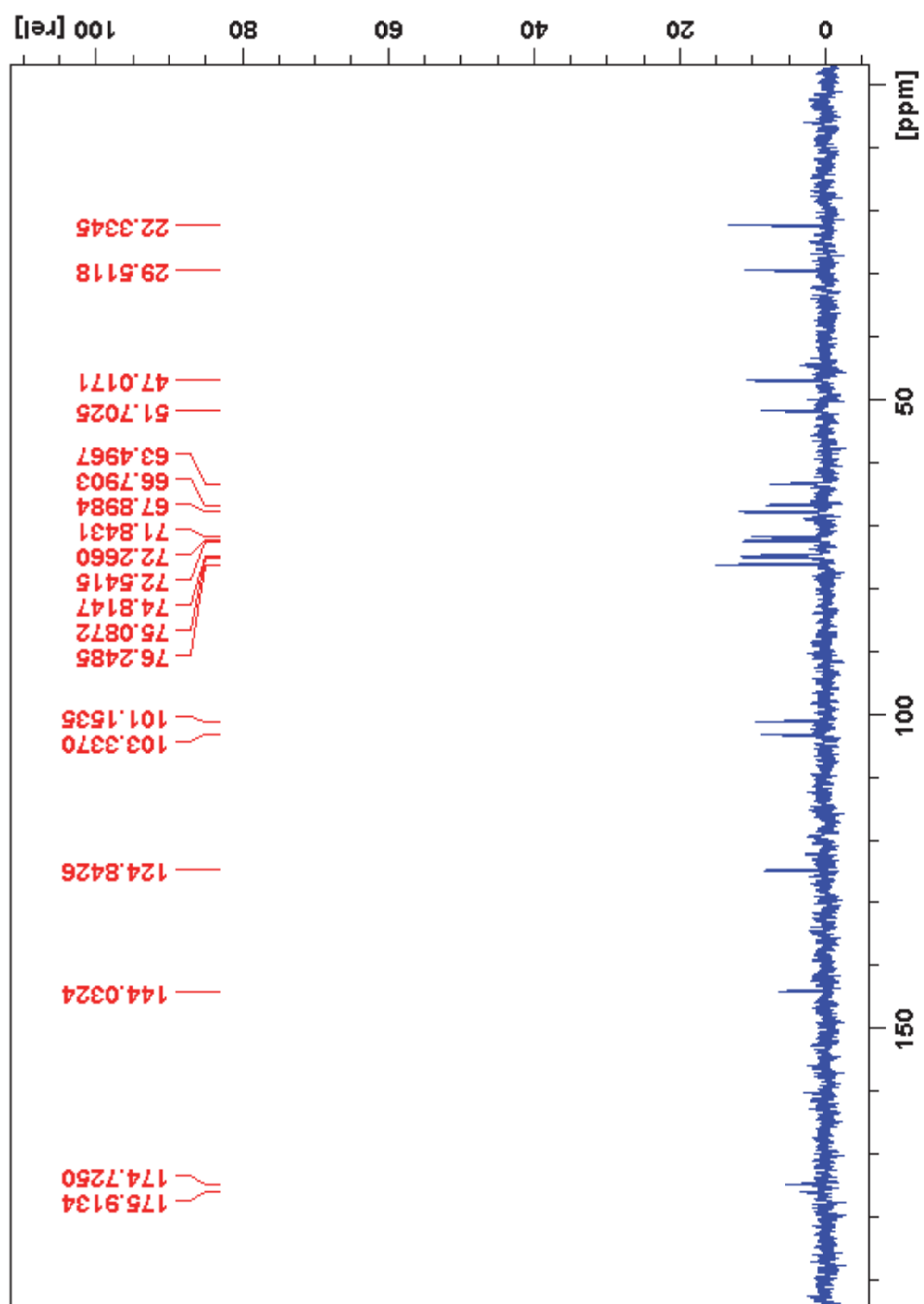
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



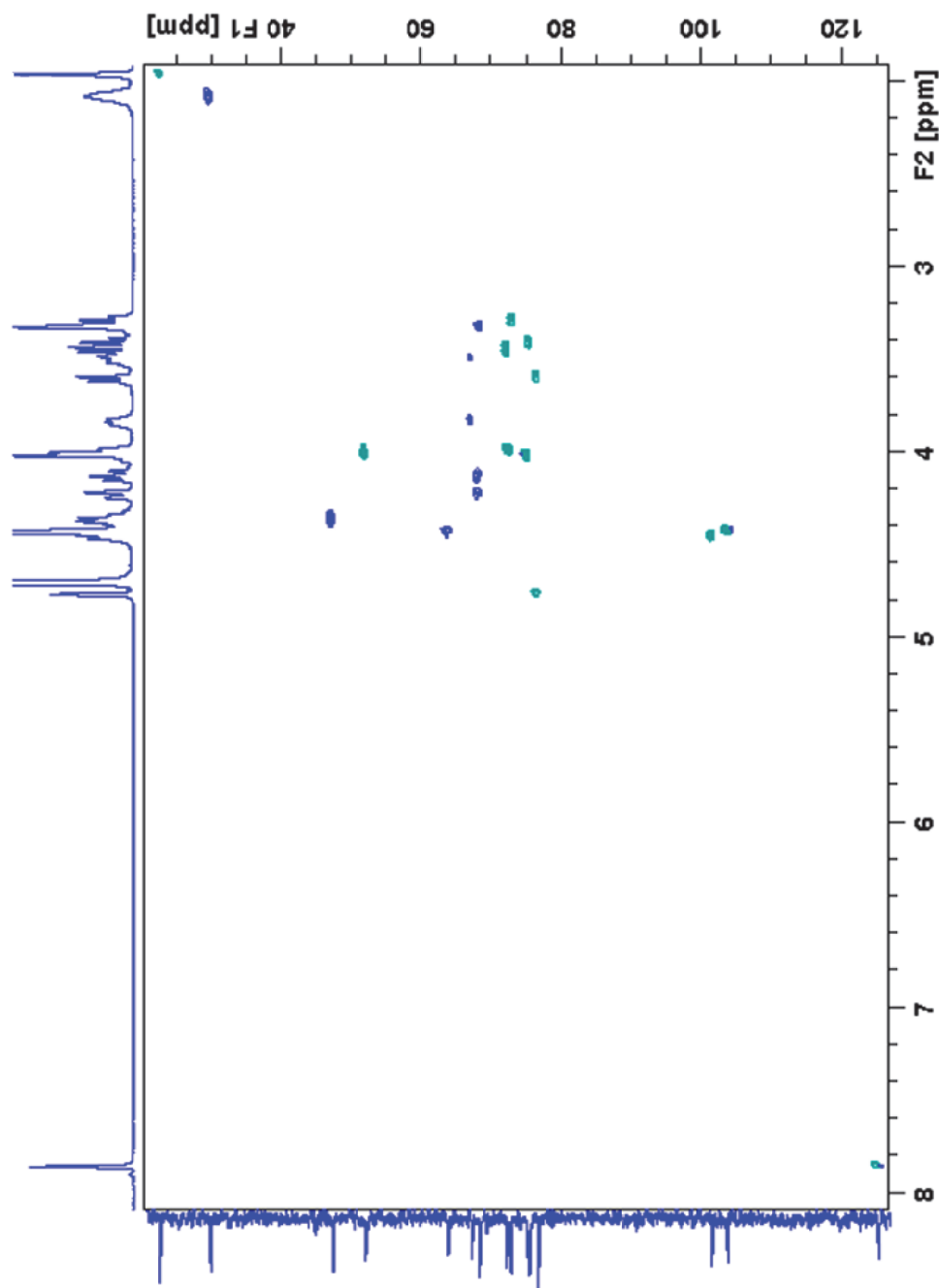
Dendrímero 23 (<sup>1</sup>H-RMN, 400 MHz, D<sub>2</sub>O)



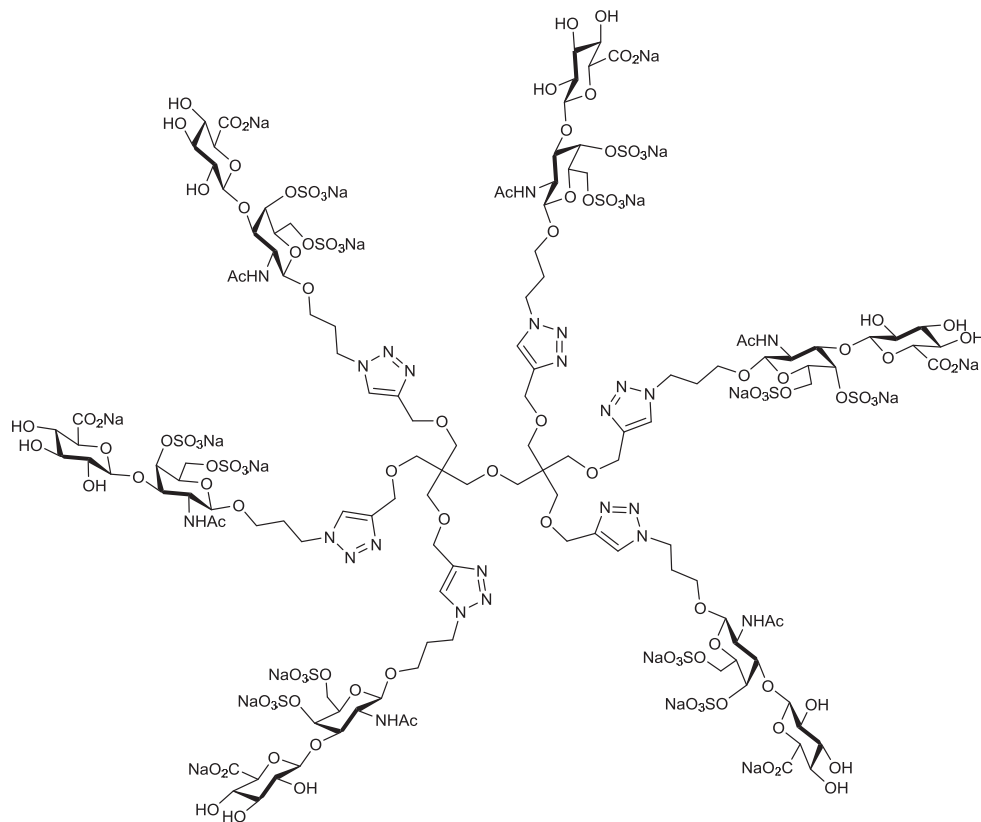
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

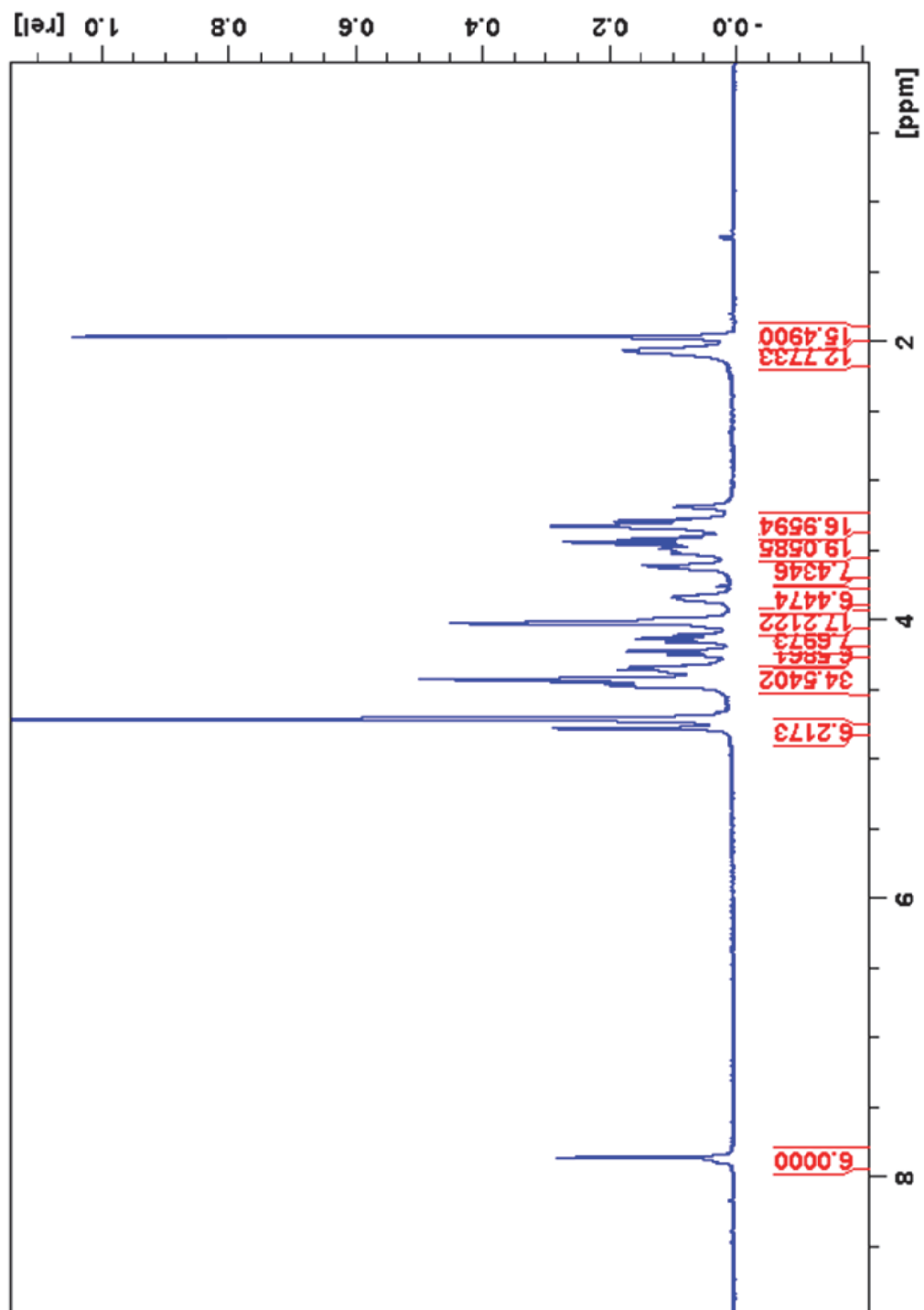


(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)

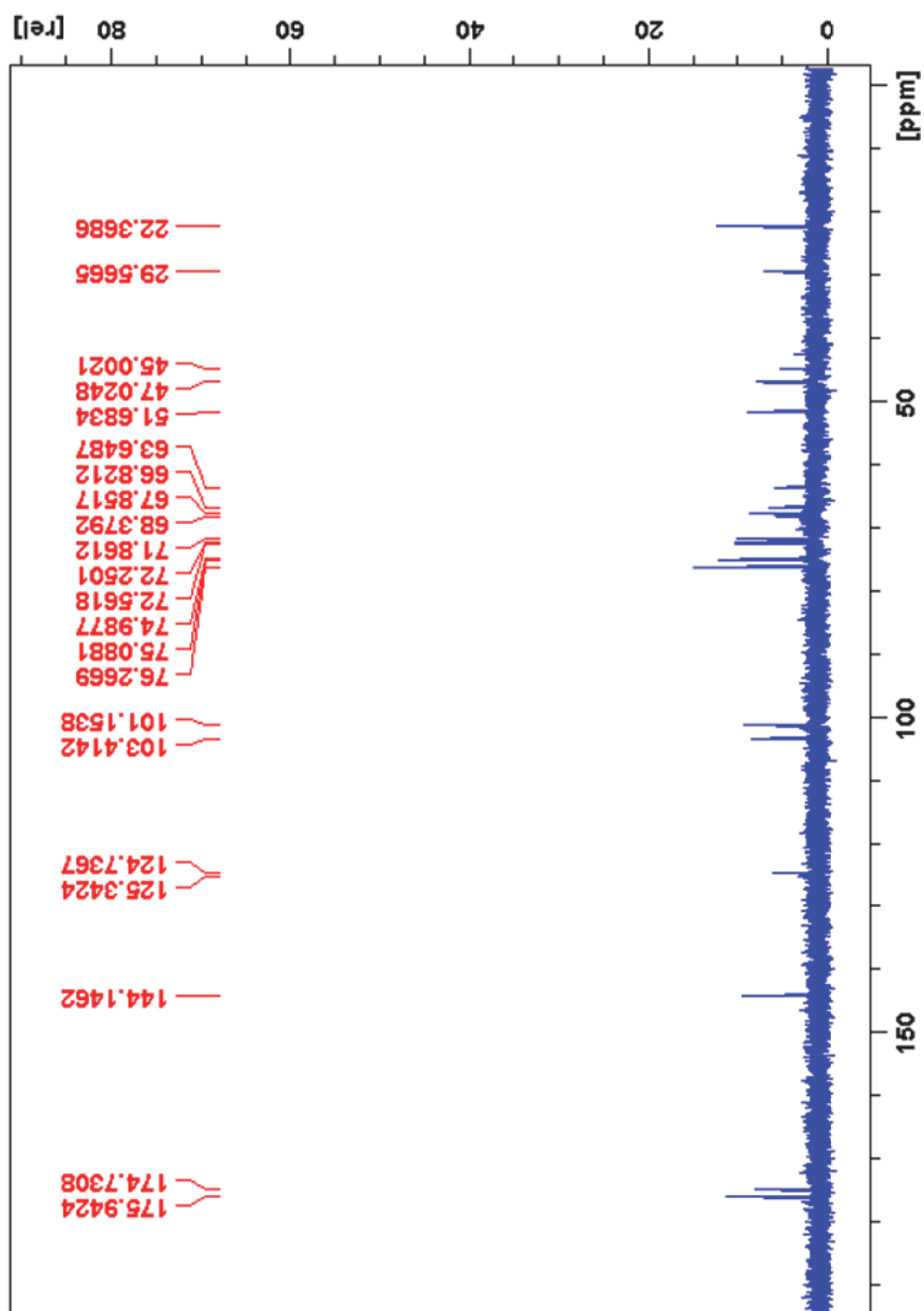


**Dendrímero 24** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



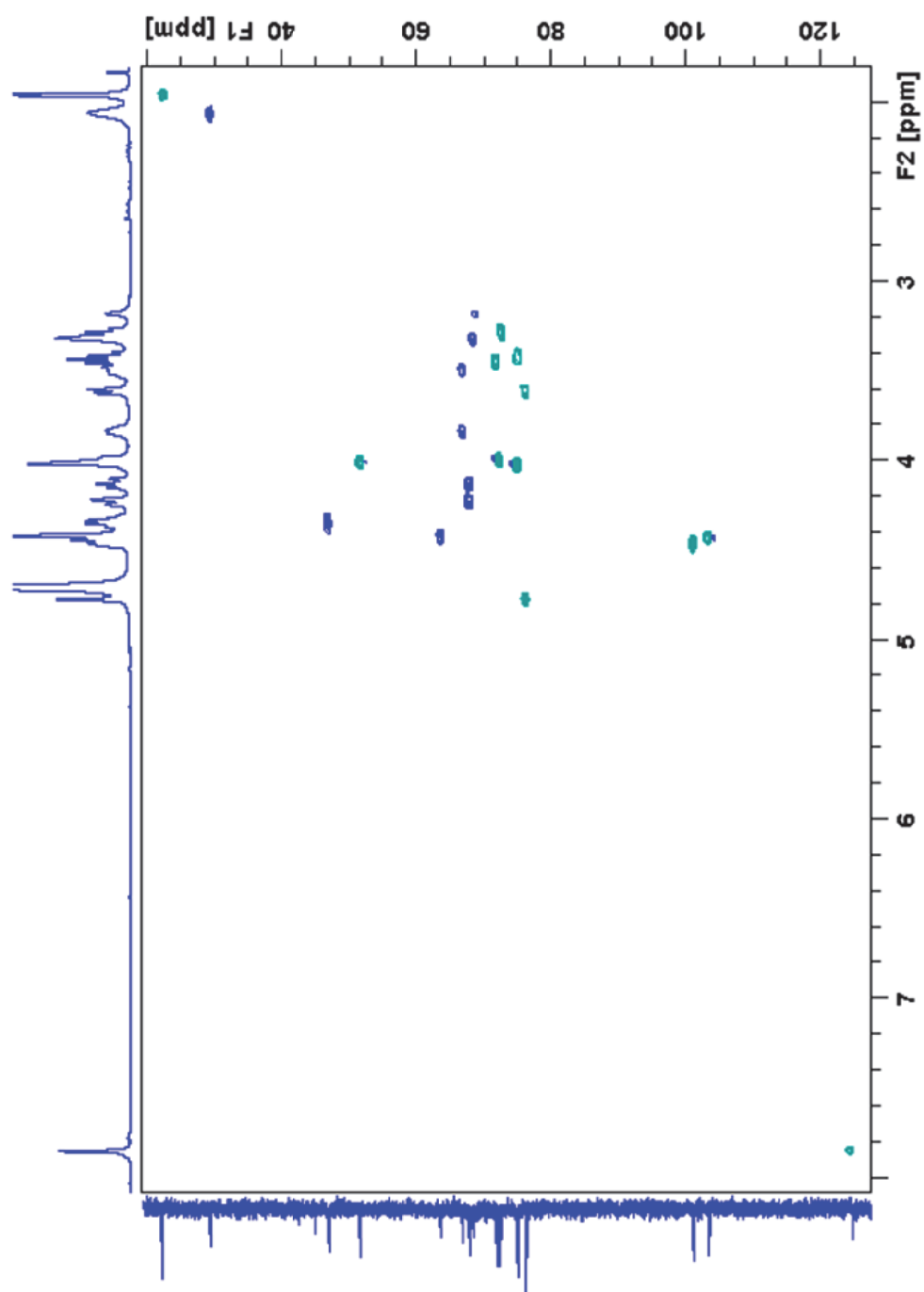


( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

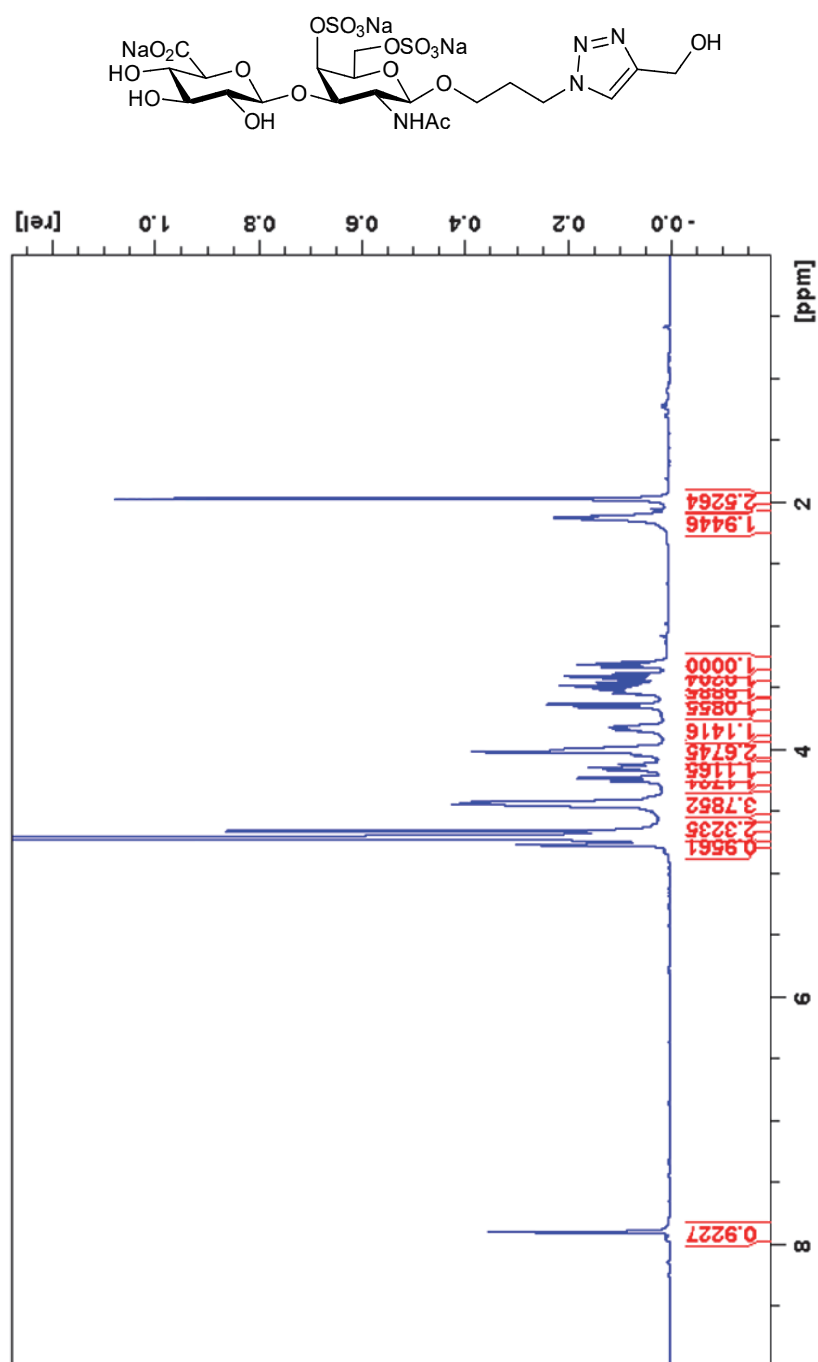




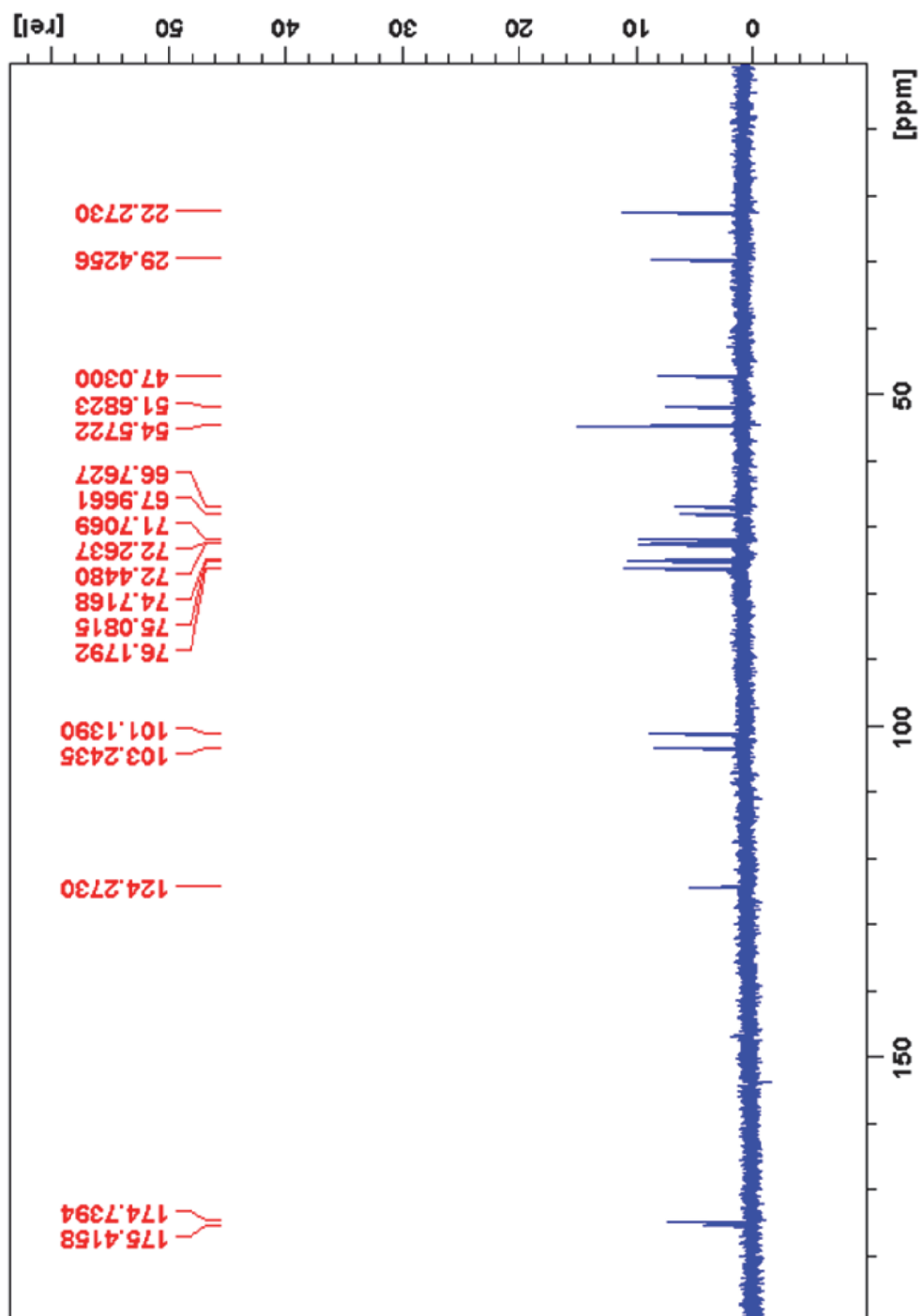
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



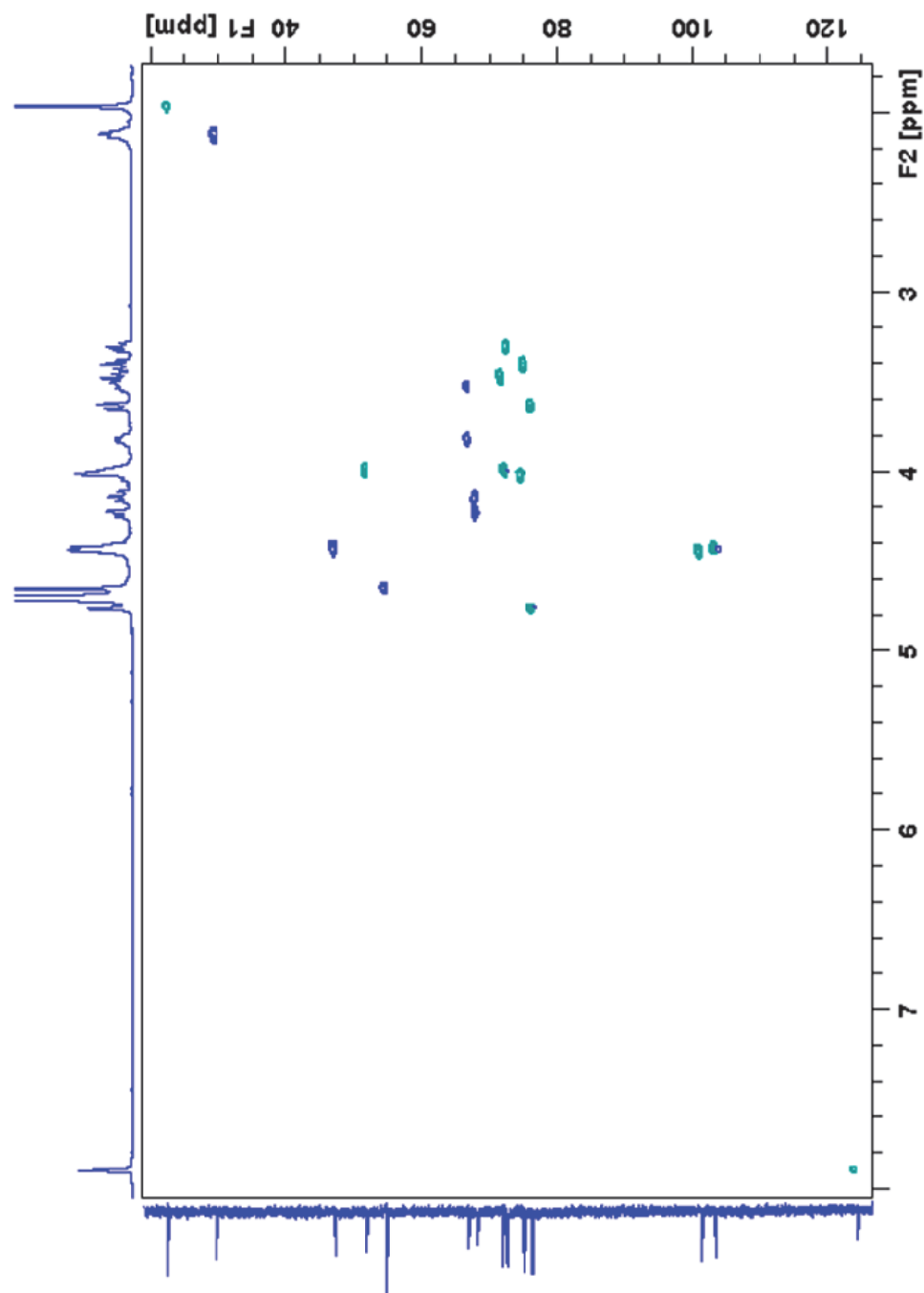
**Compuesto 26** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



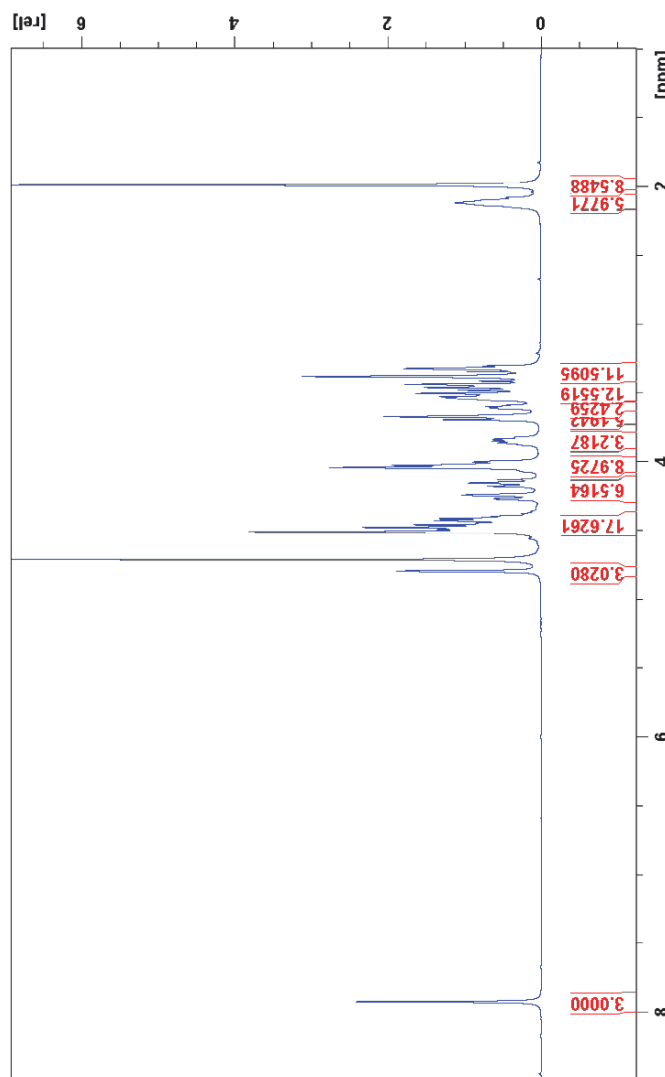
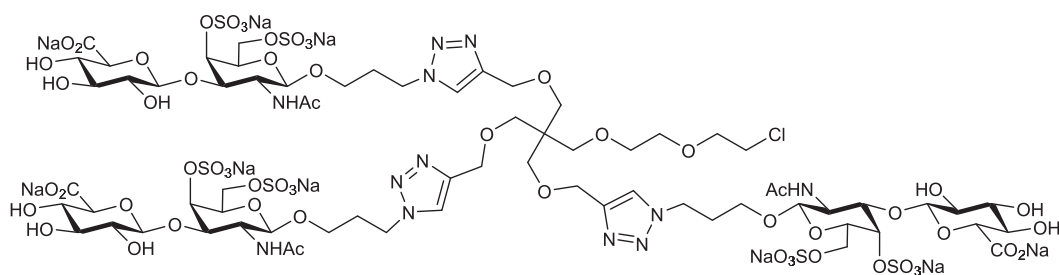
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



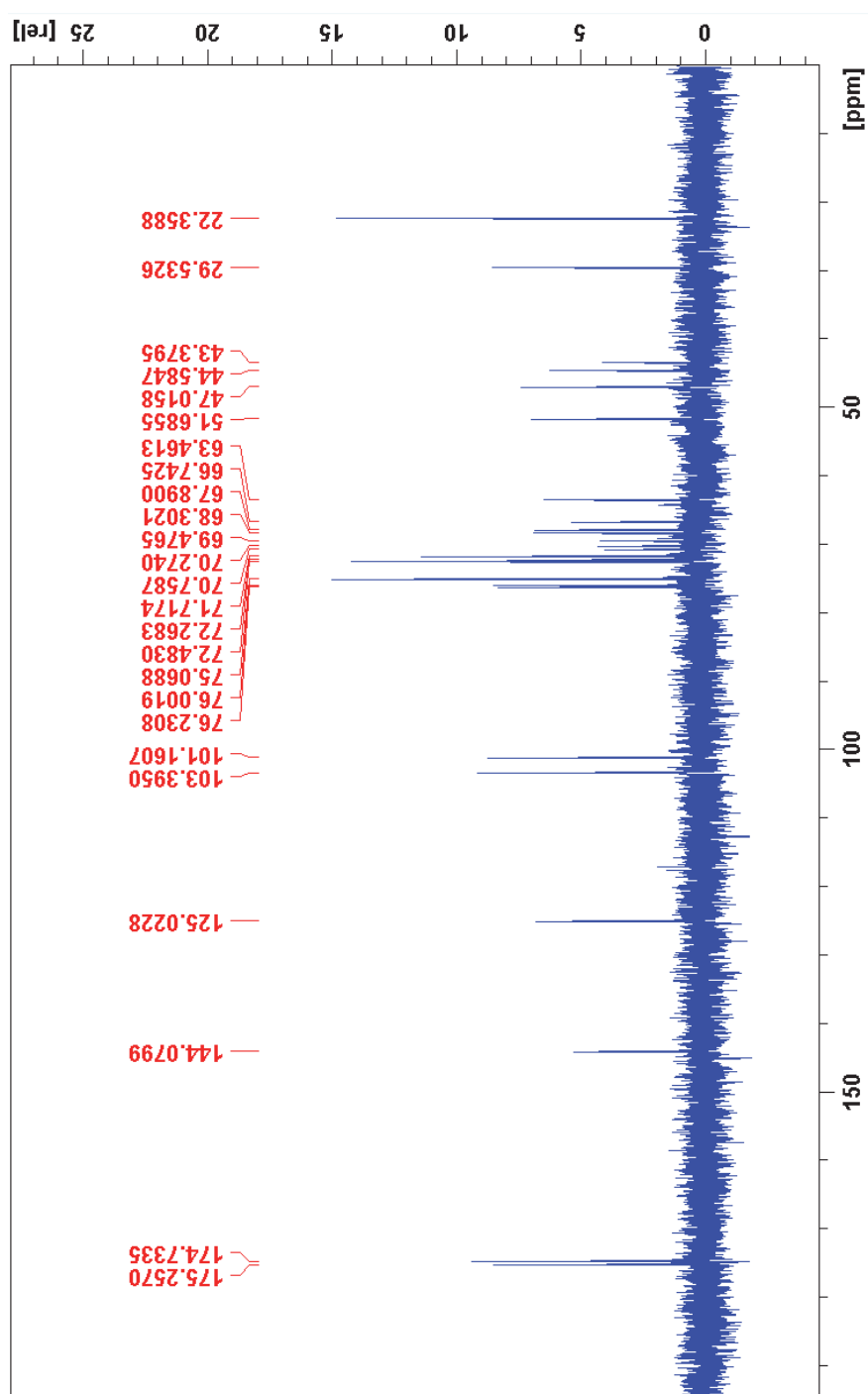
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



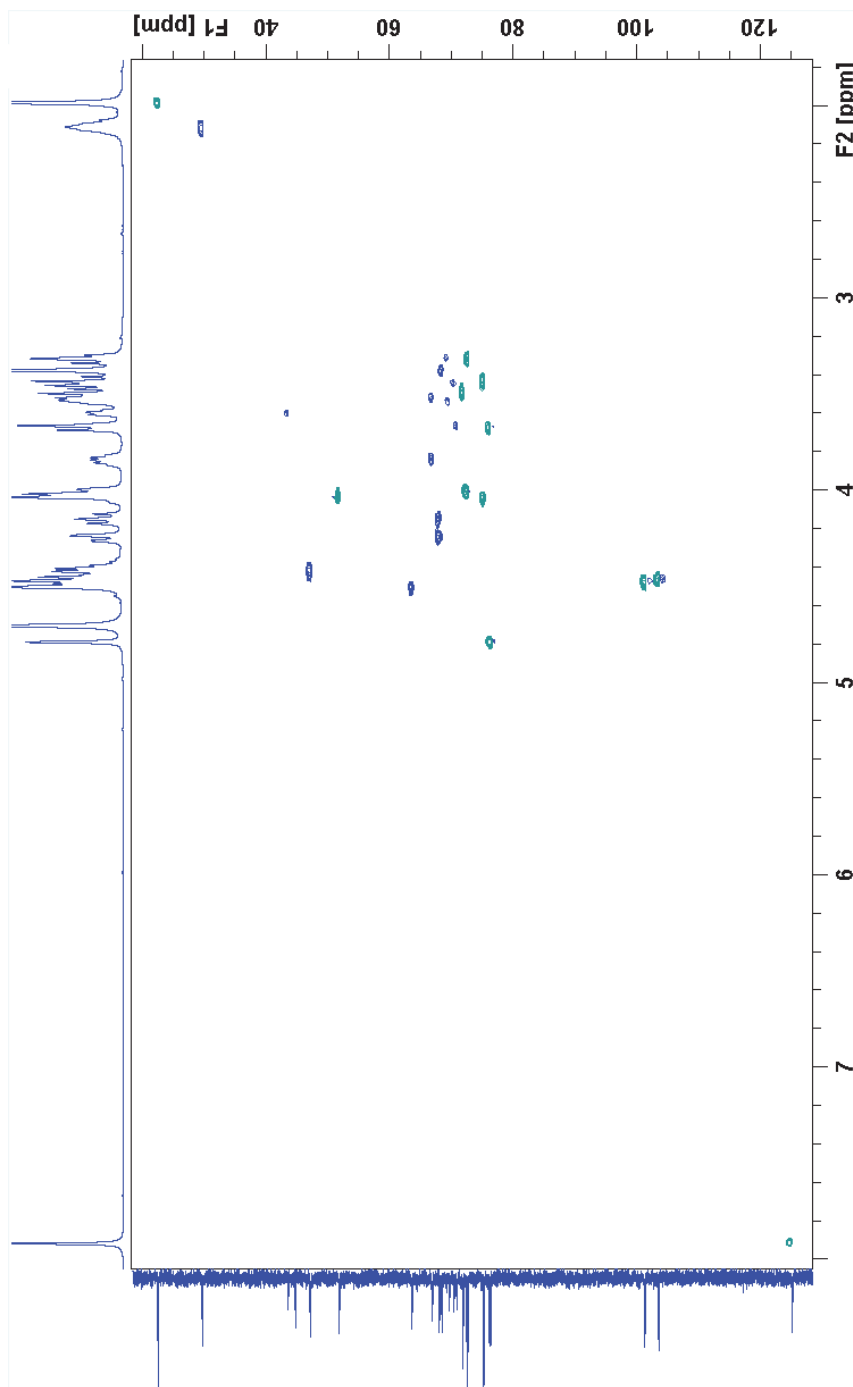
Dendrón 29 ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



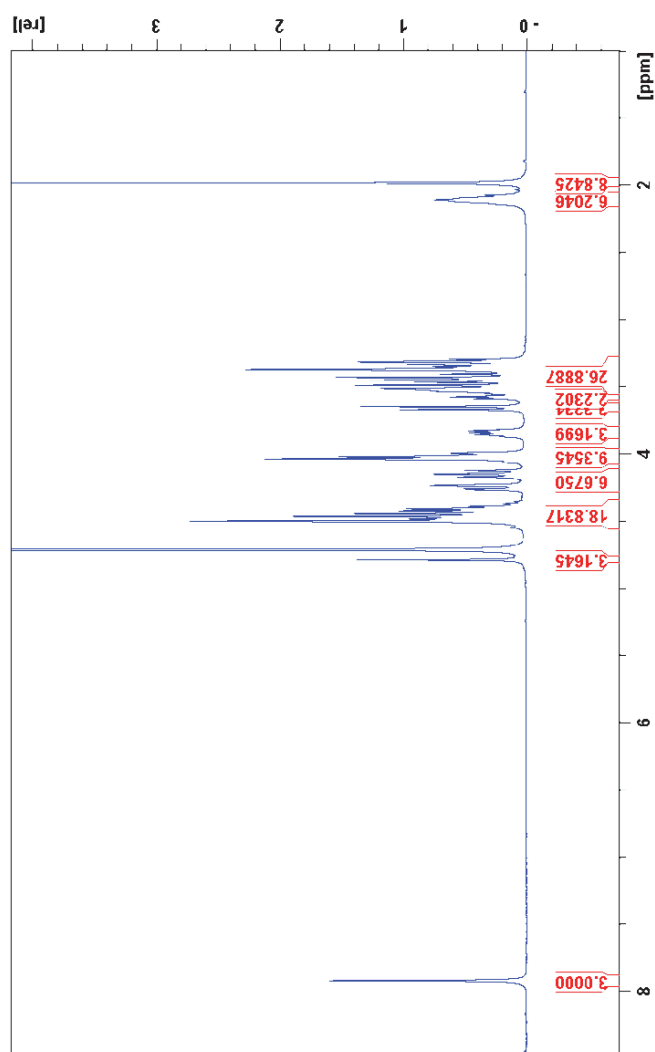
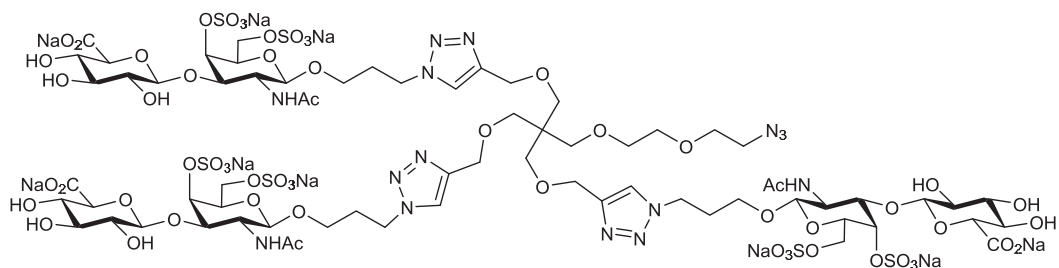
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)

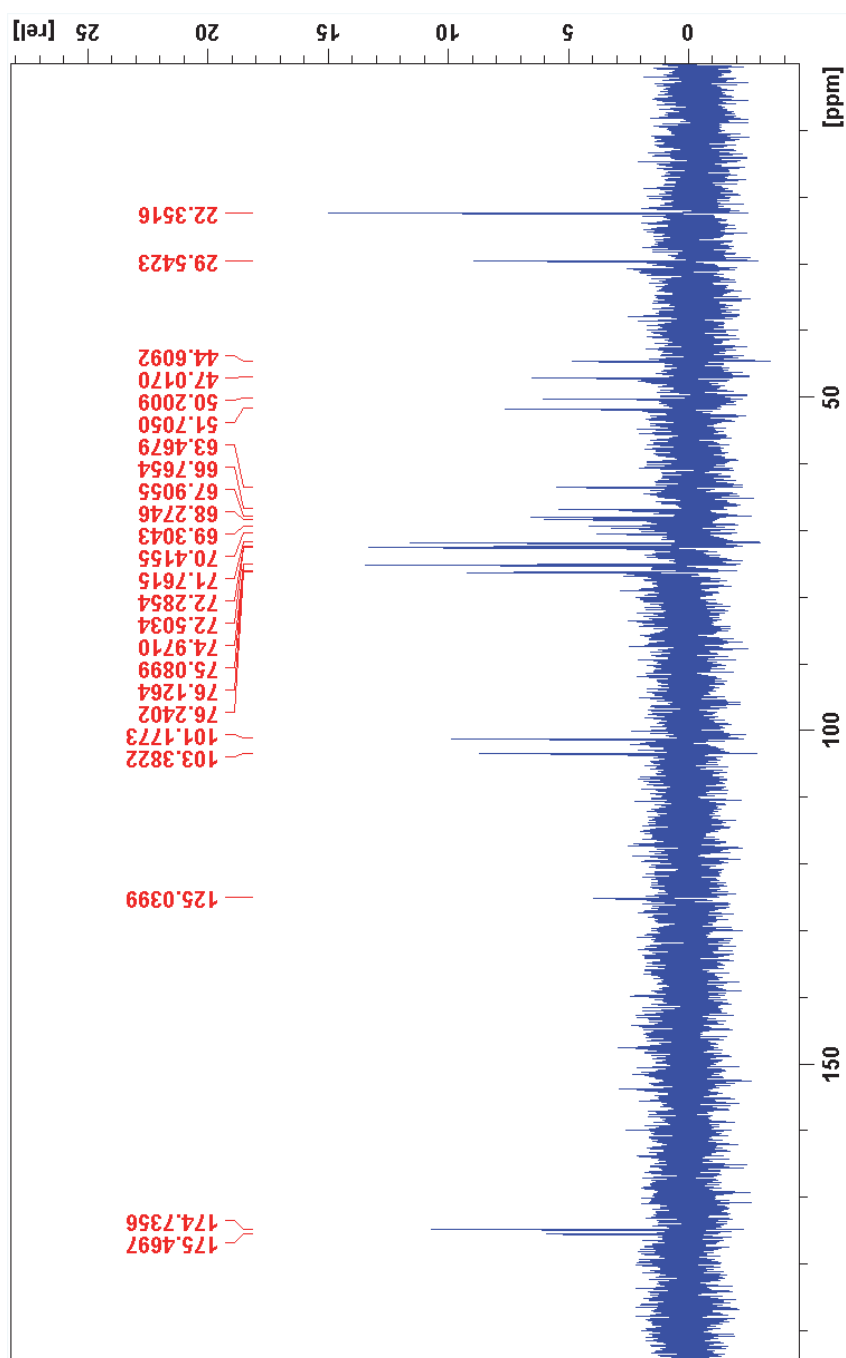


Dendrón 30 ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

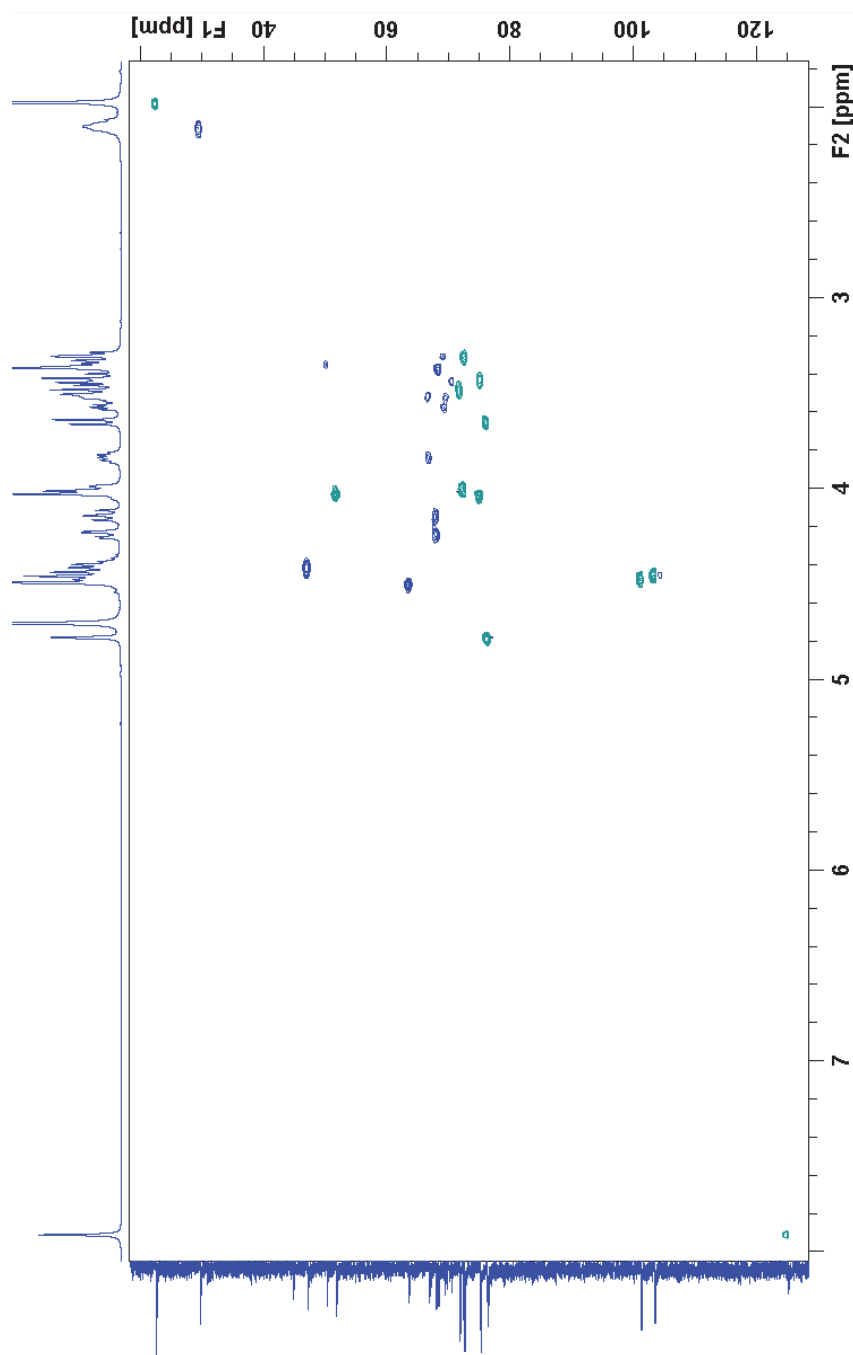




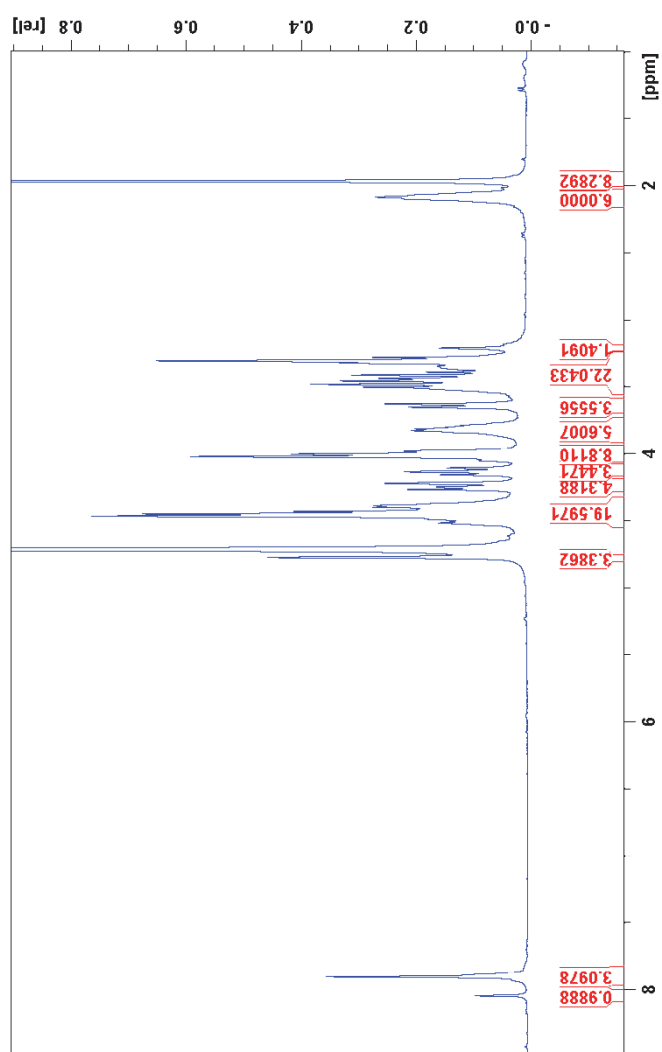
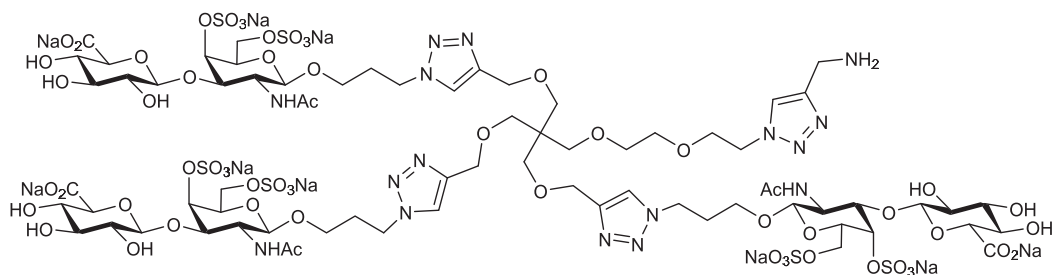
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



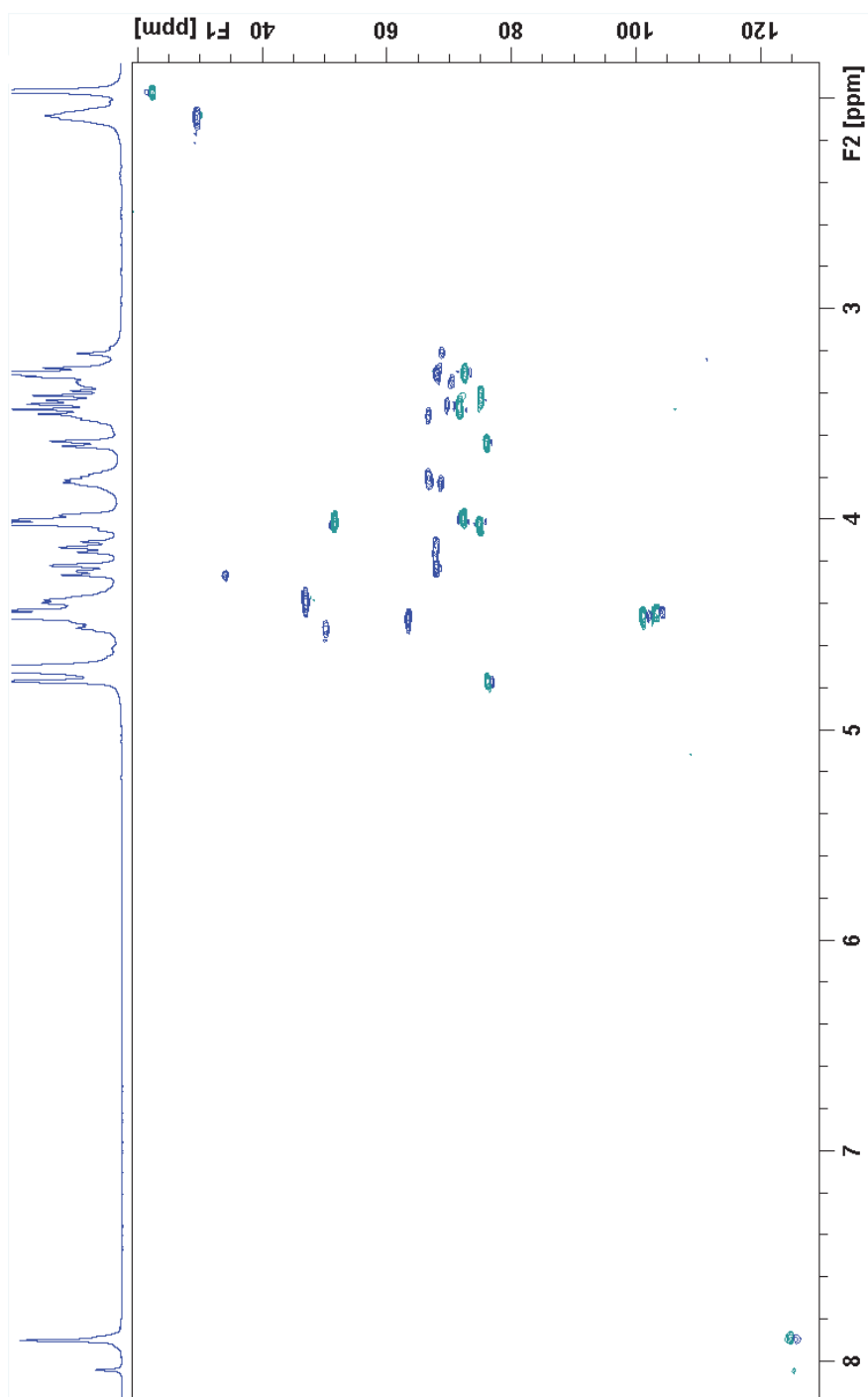
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



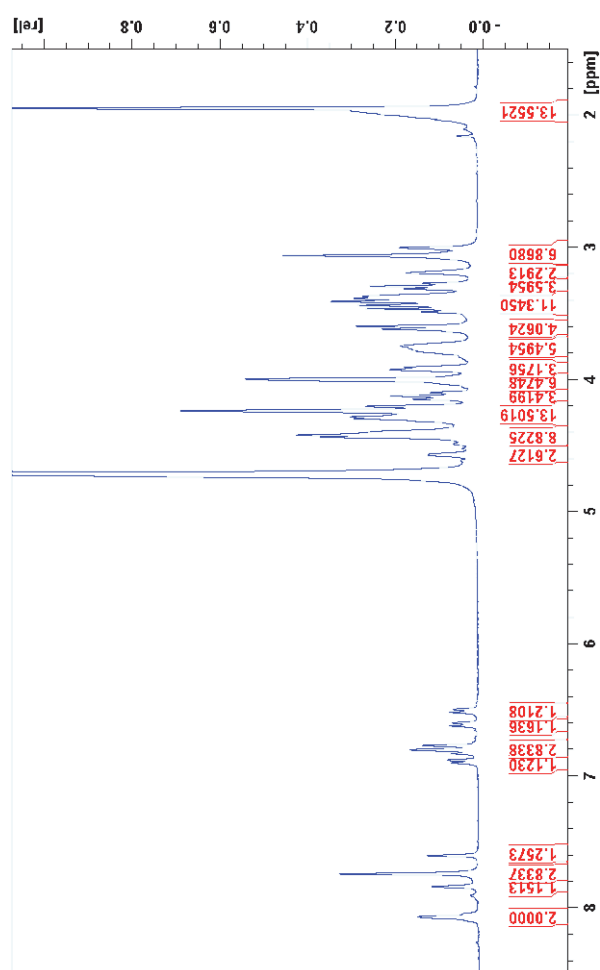
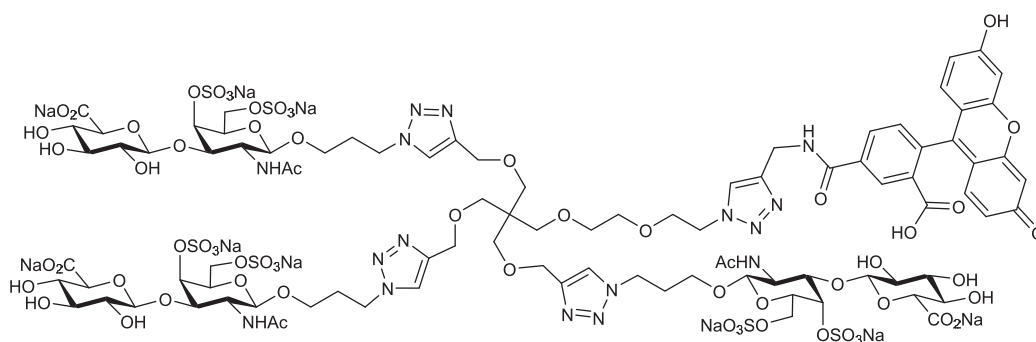
**Dendrón 32** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



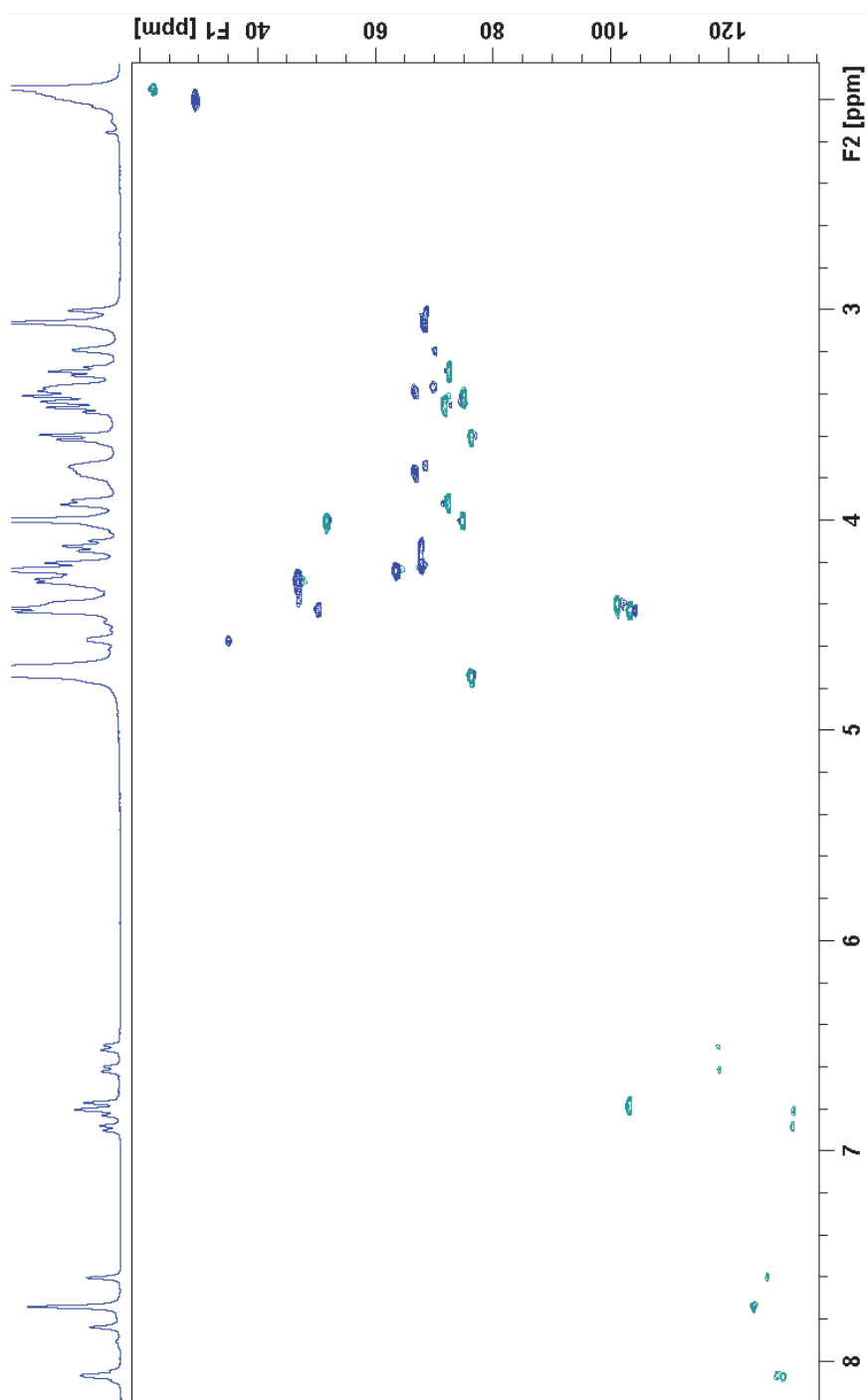
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



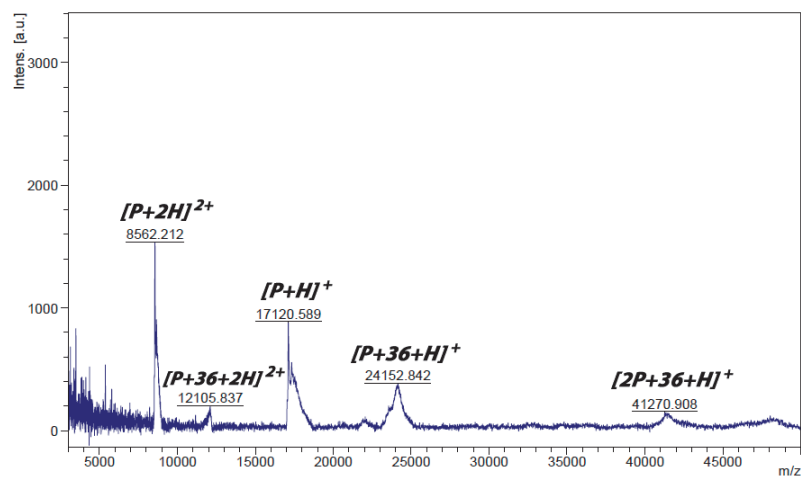
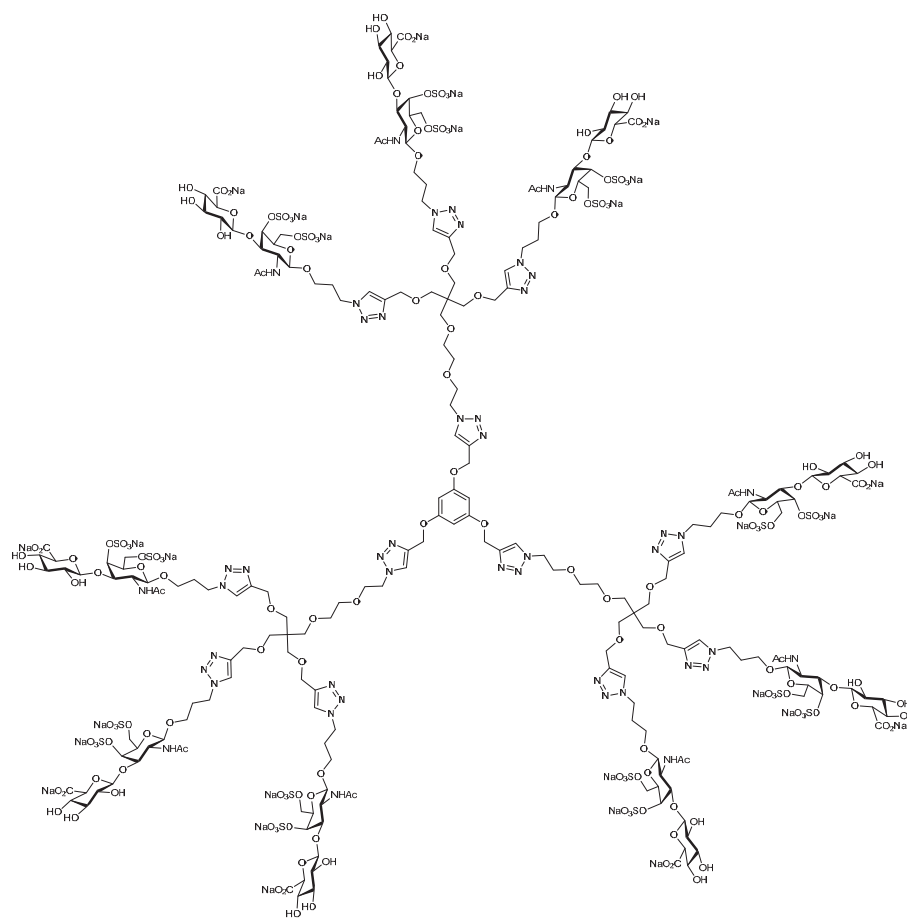
Dendrón 35 ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



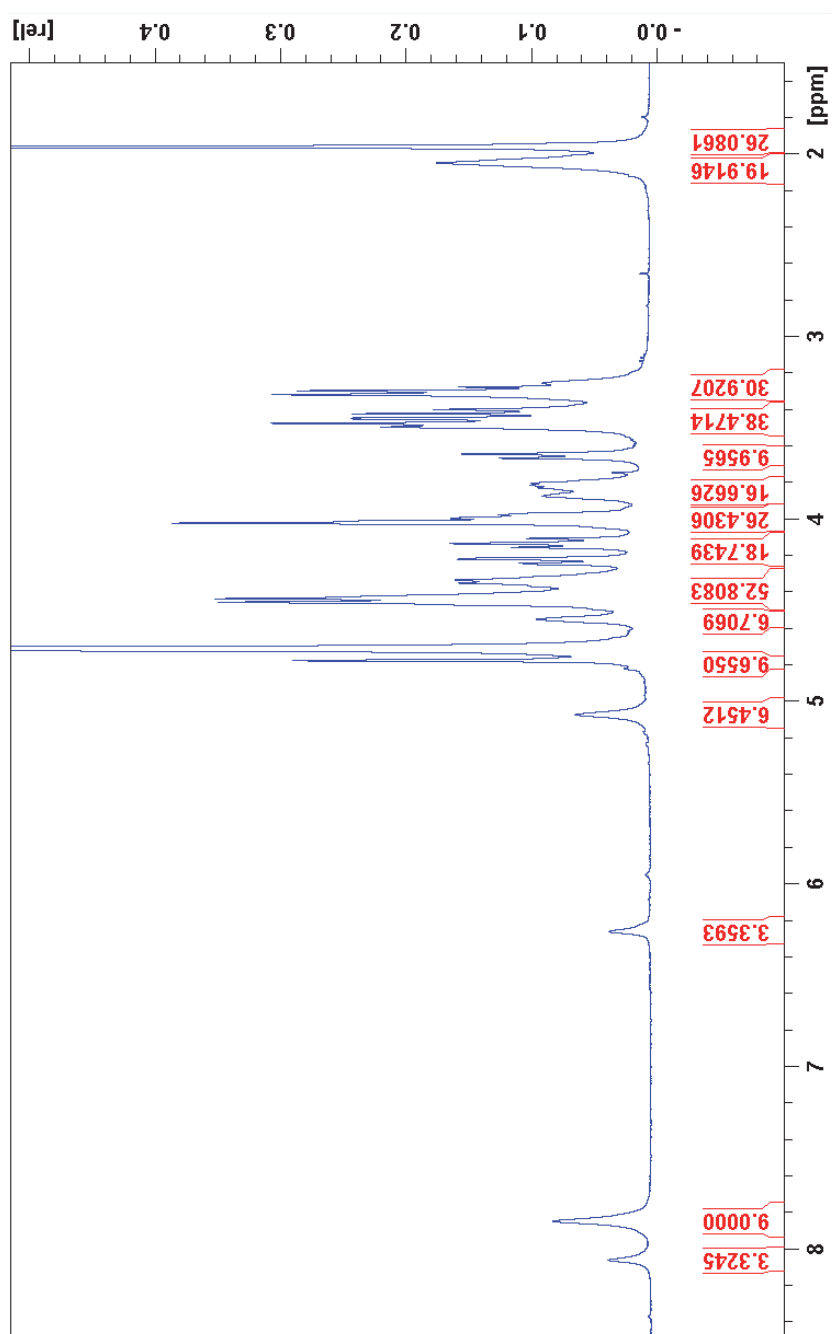
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



# Dendrímero 36 (MALDI-ToF con FGF-2)

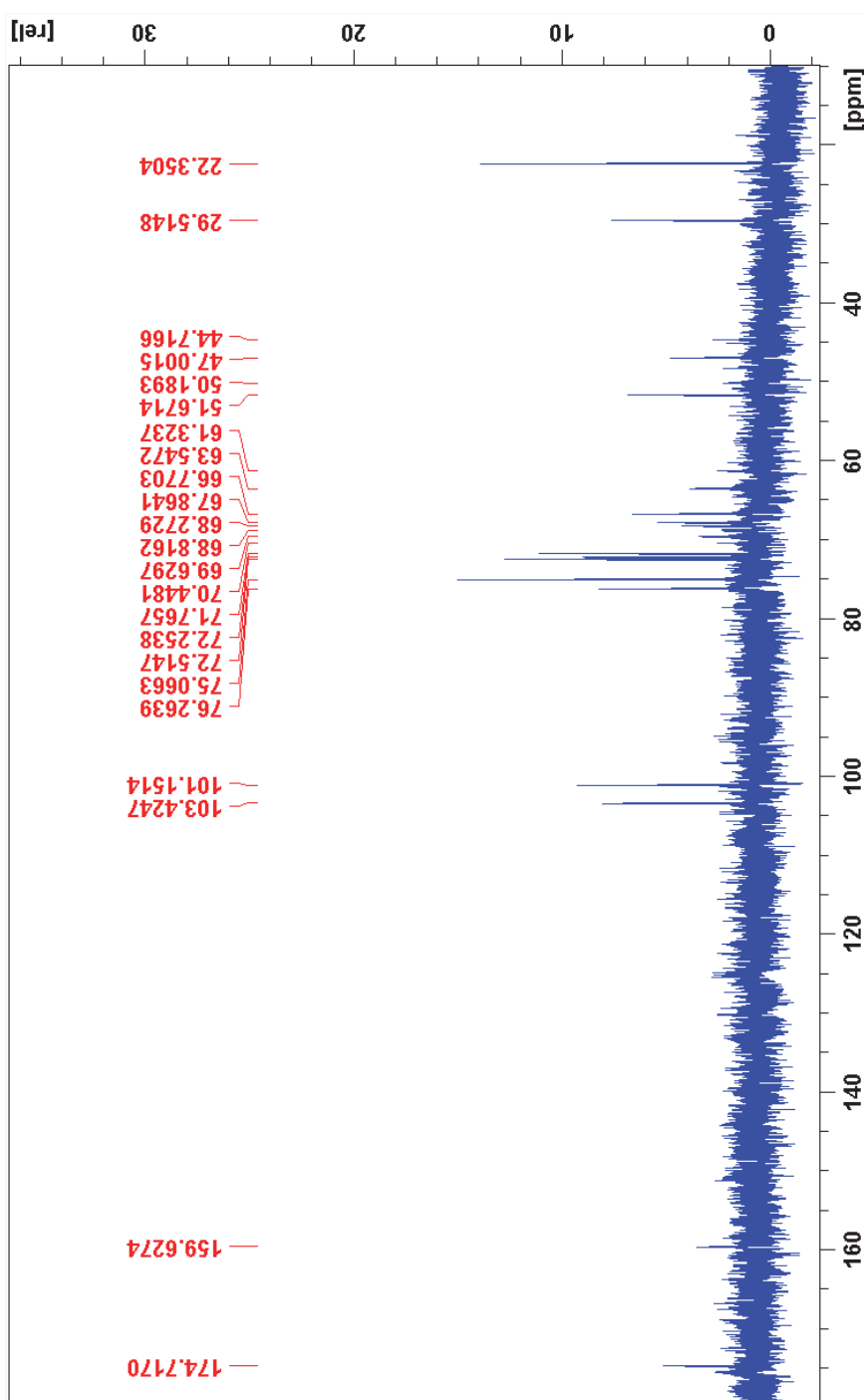


(<sup>1</sup>H-RMN, 400 MHz, D<sub>2</sub>O)

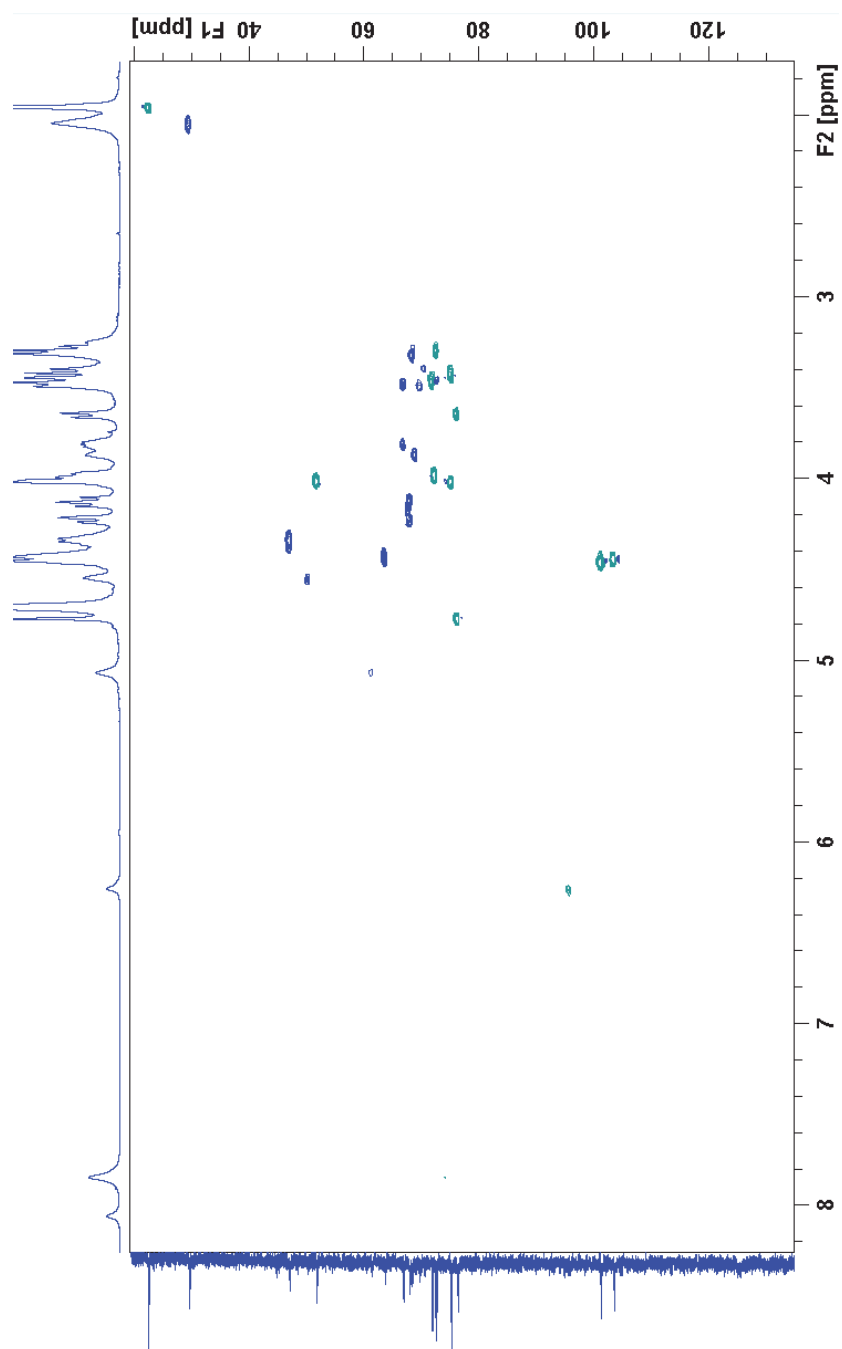




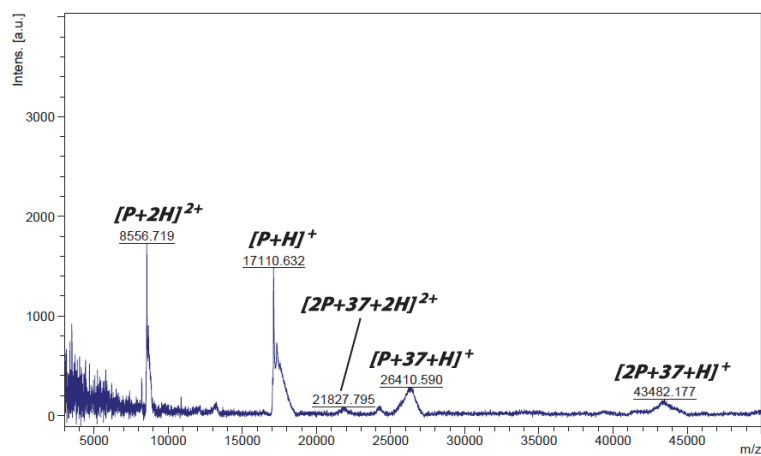
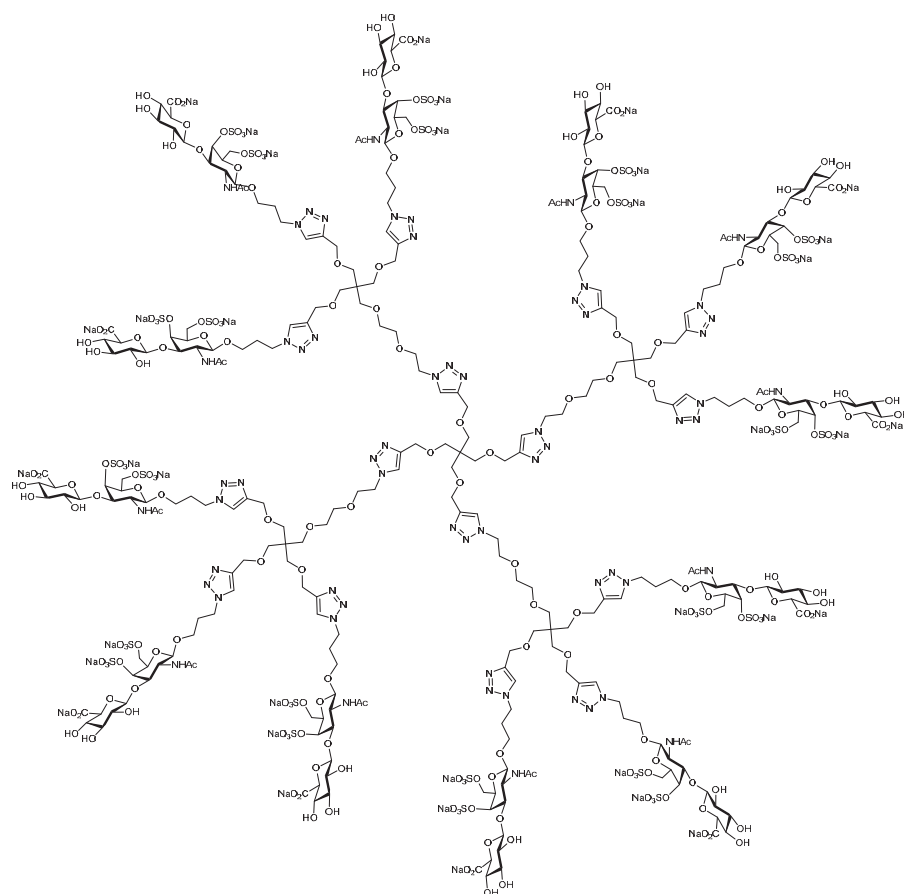
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



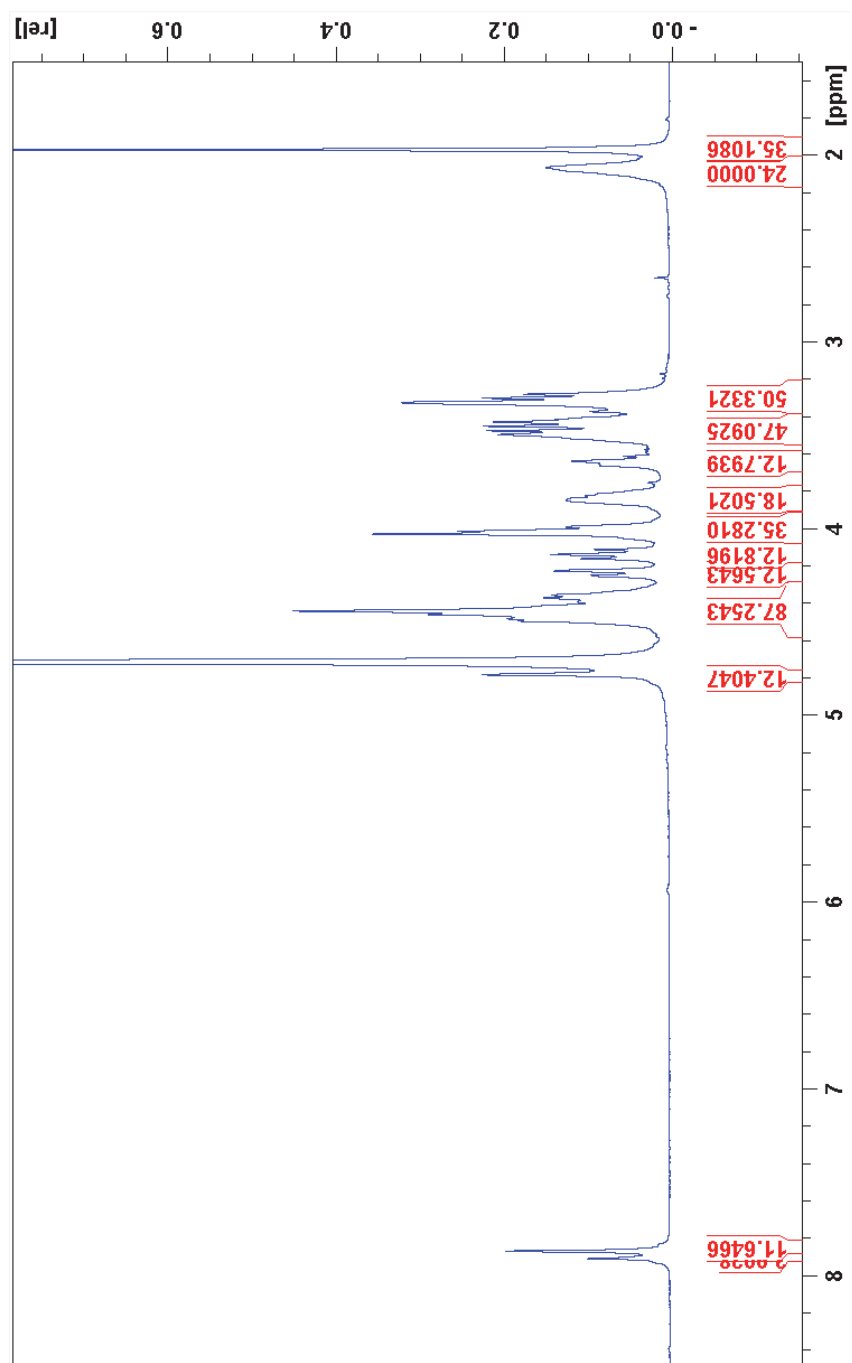
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



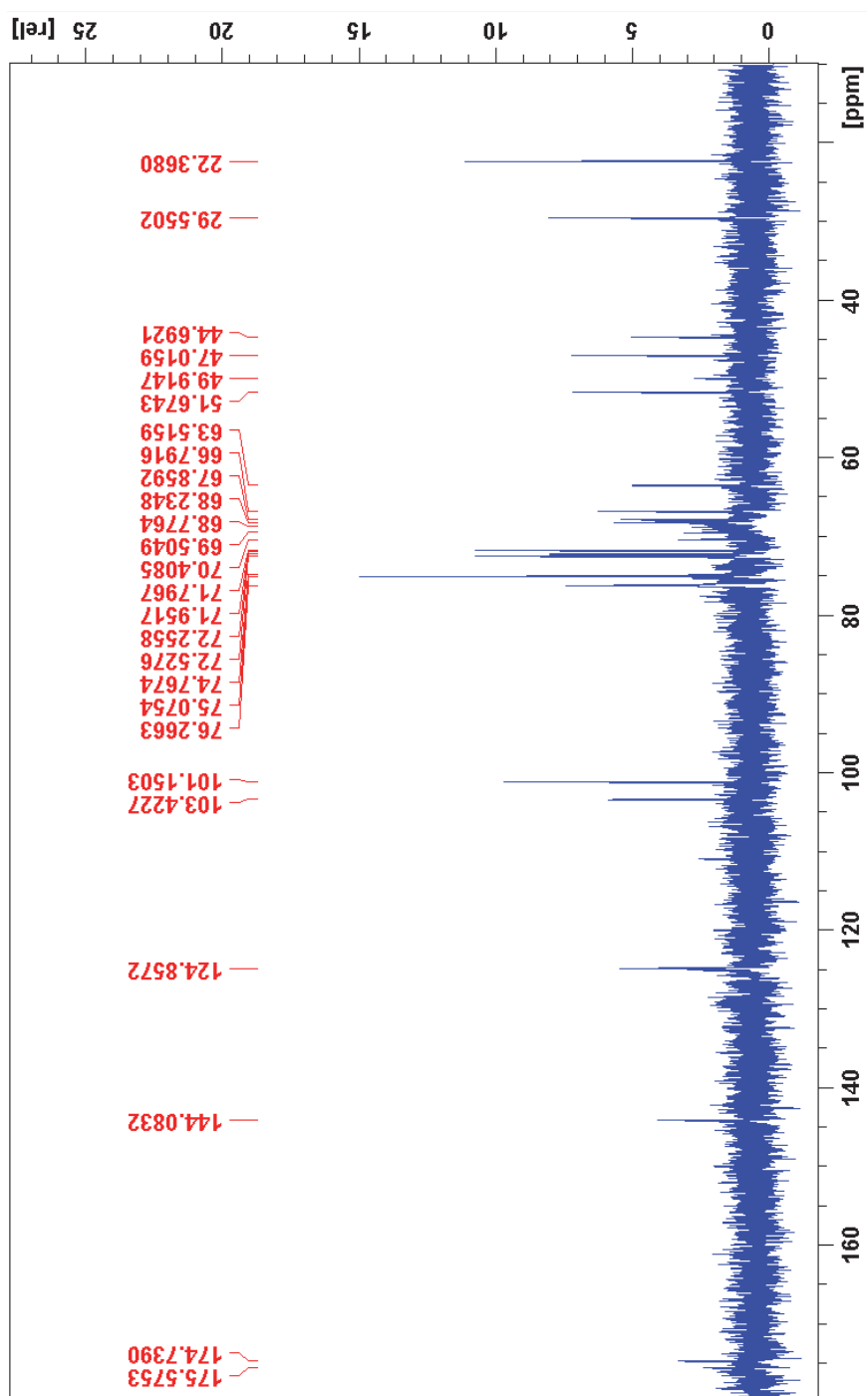
# Dendrímero 37 (MALDI-ToF con FGF-2)



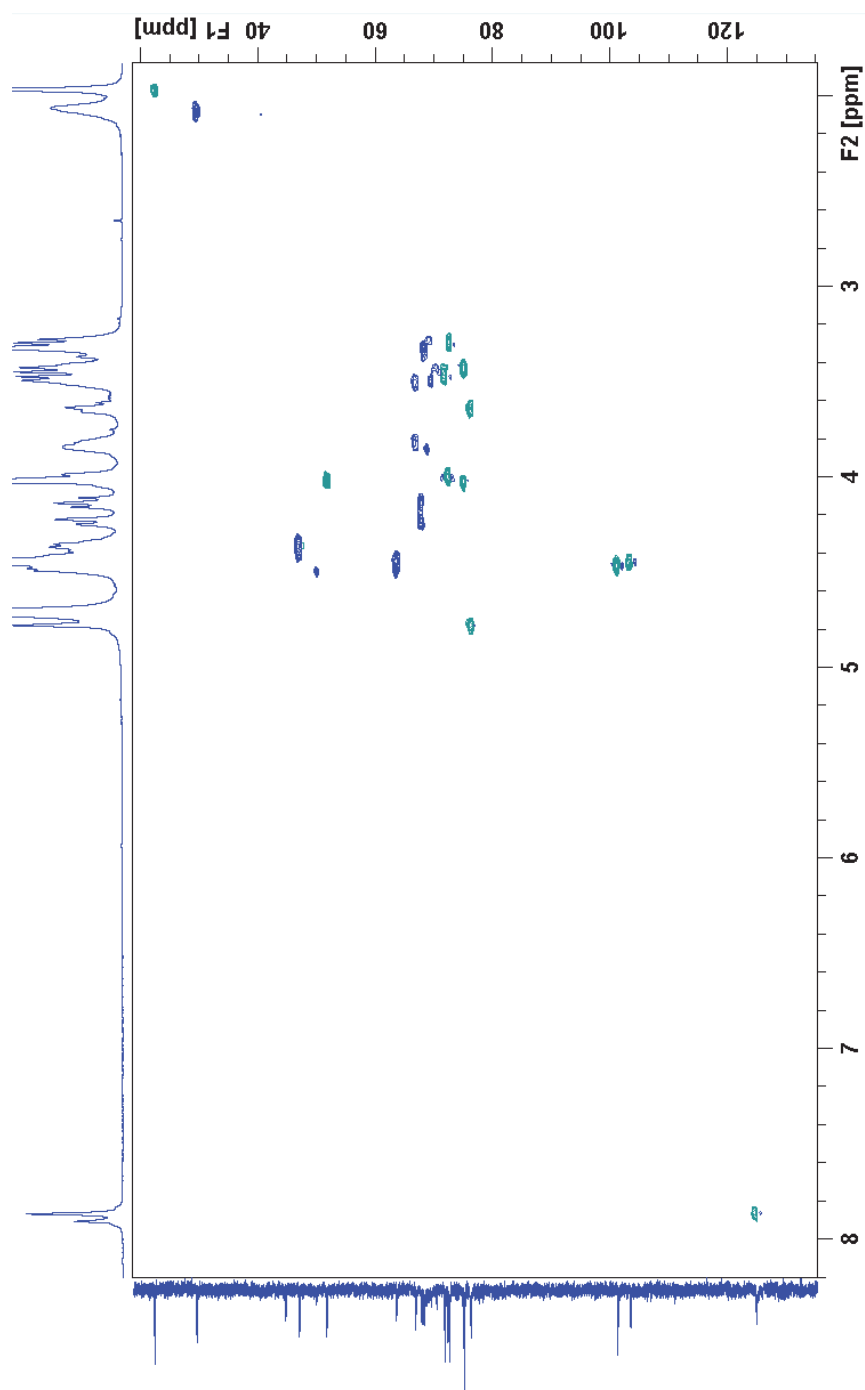
(<sup>1</sup>H-RMN, 400 MHz, D<sub>2</sub>O)



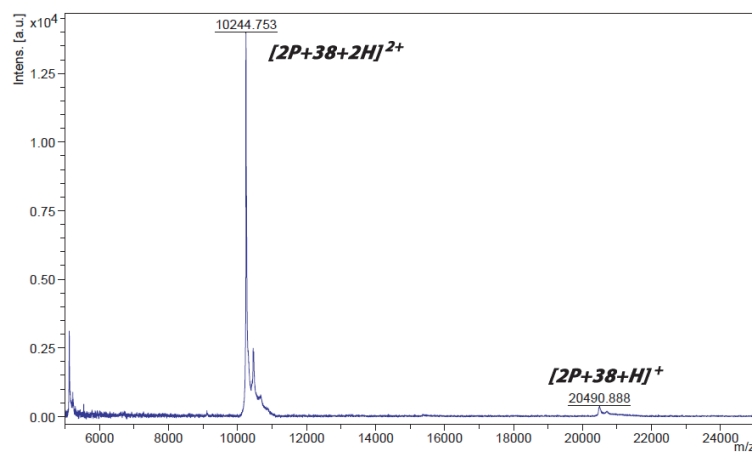
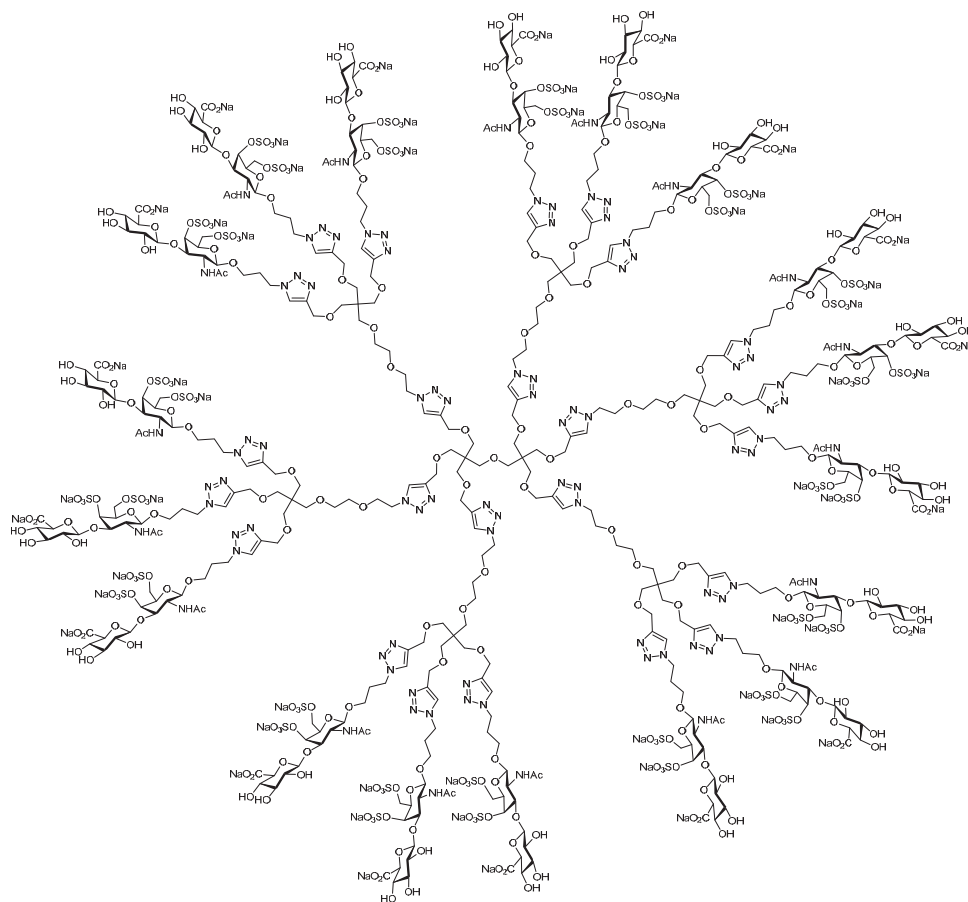
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



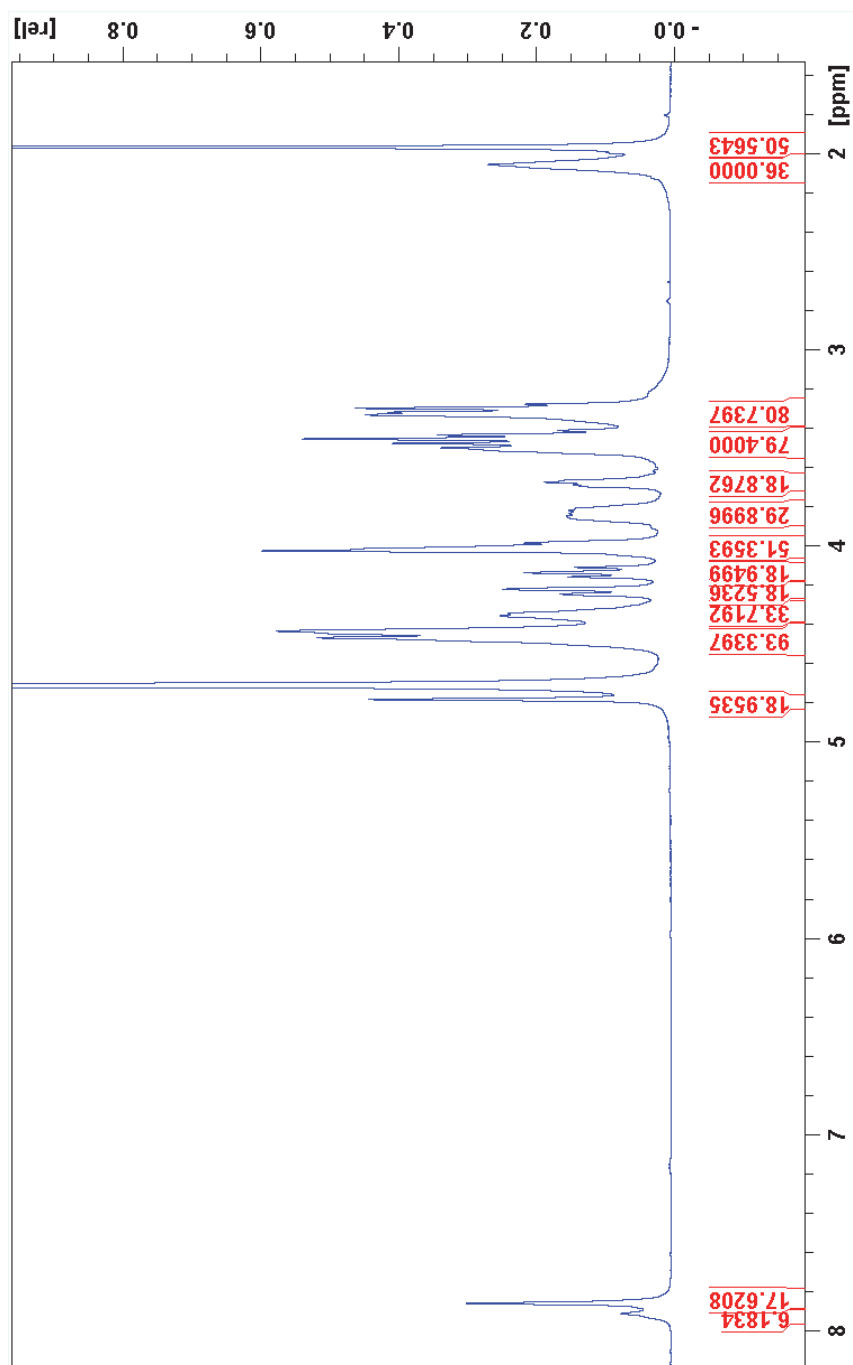
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



**Dendrímero 38 (MALDI-ToF con el péptido básico (Arg-Gly)<sub>15</sub>)**

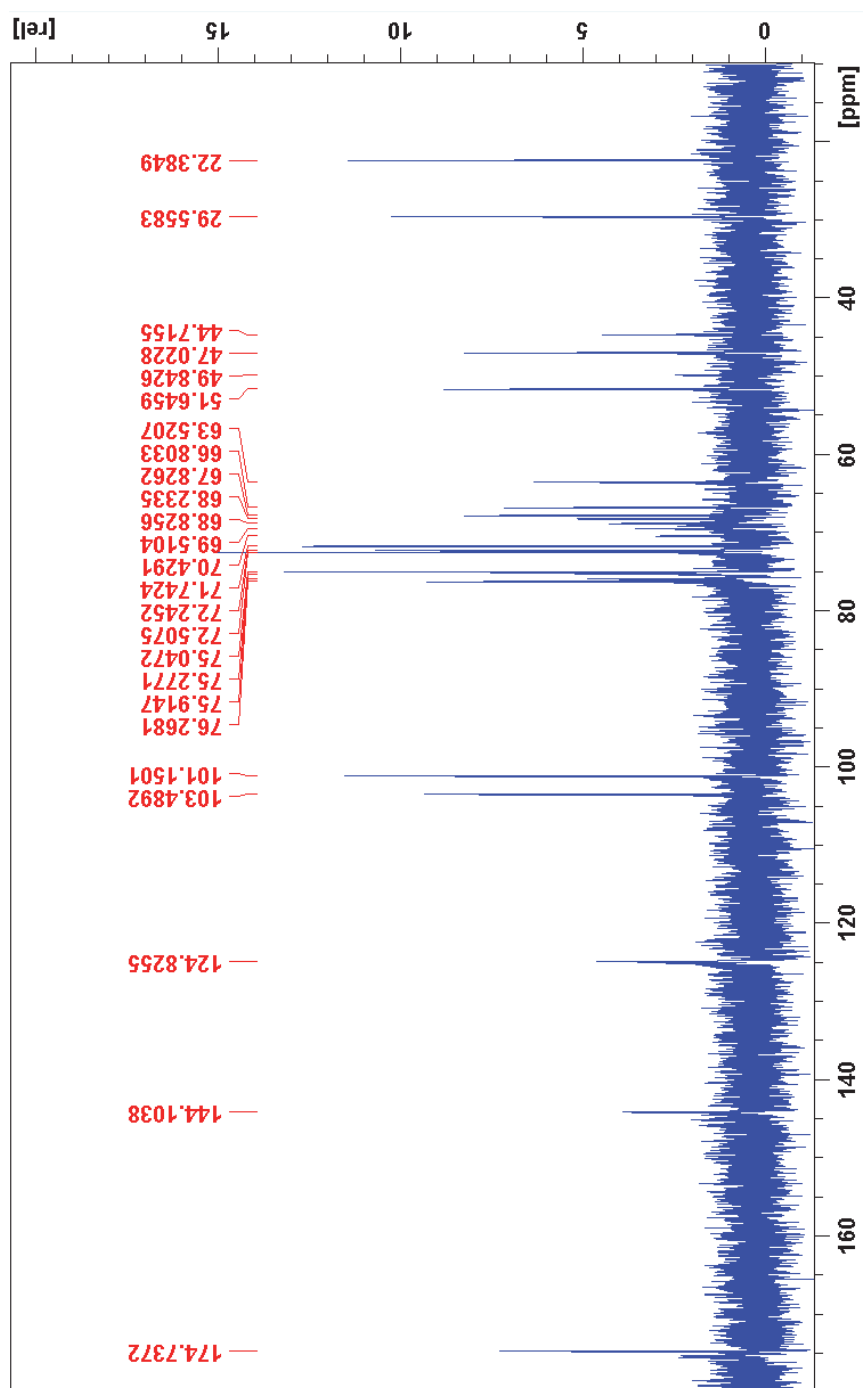


(<sup>1</sup>H-RMN, 400 MHz, D<sub>2</sub>O)

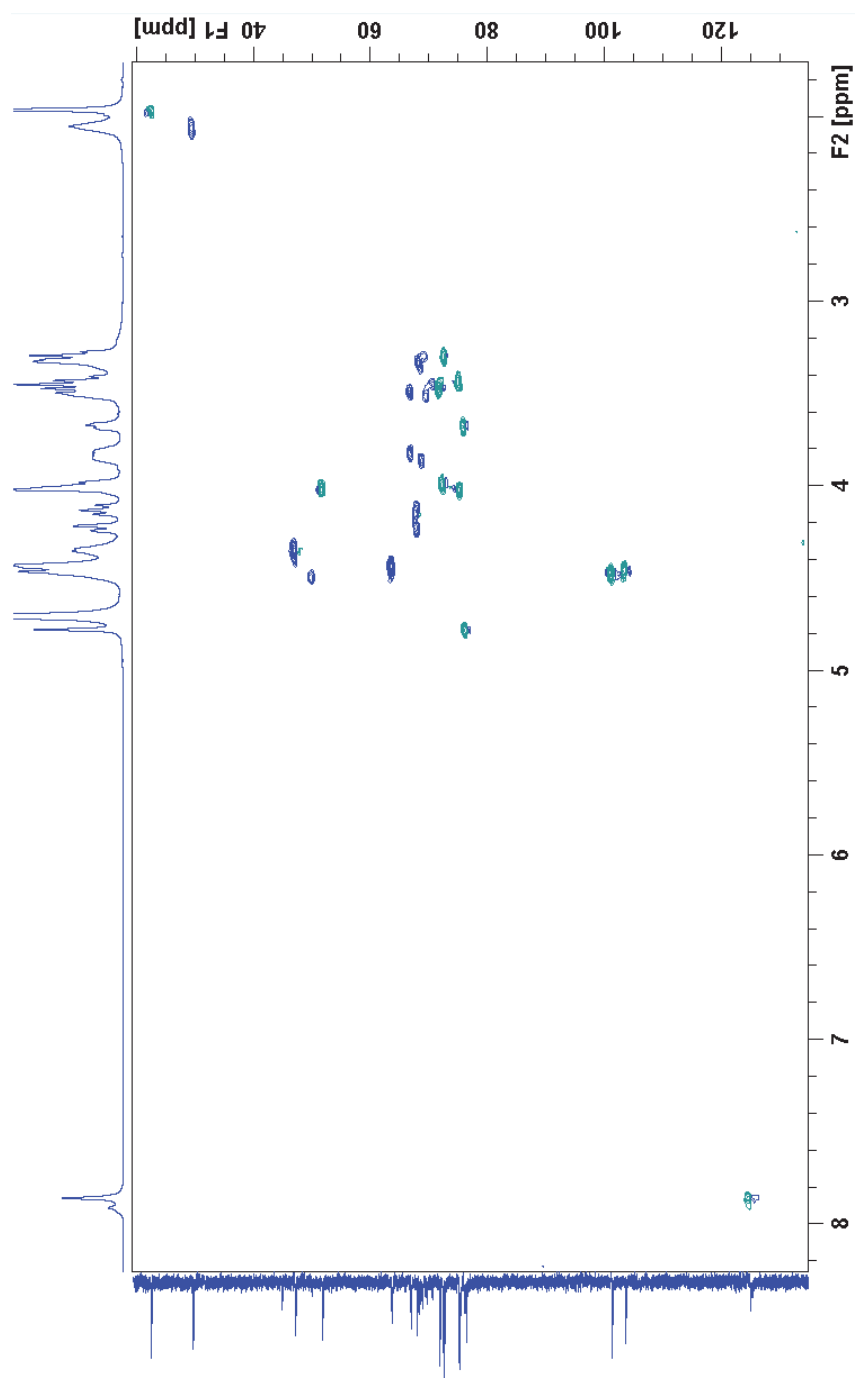




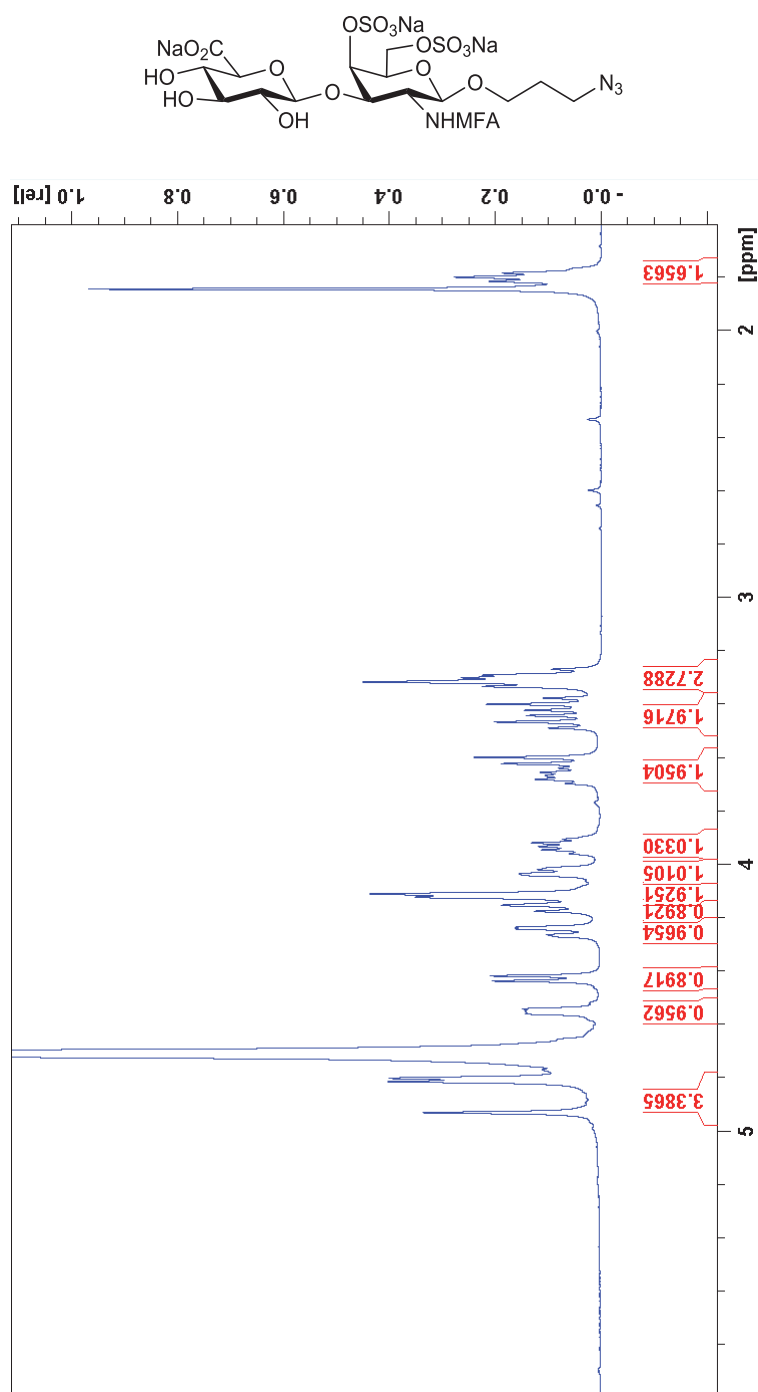
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



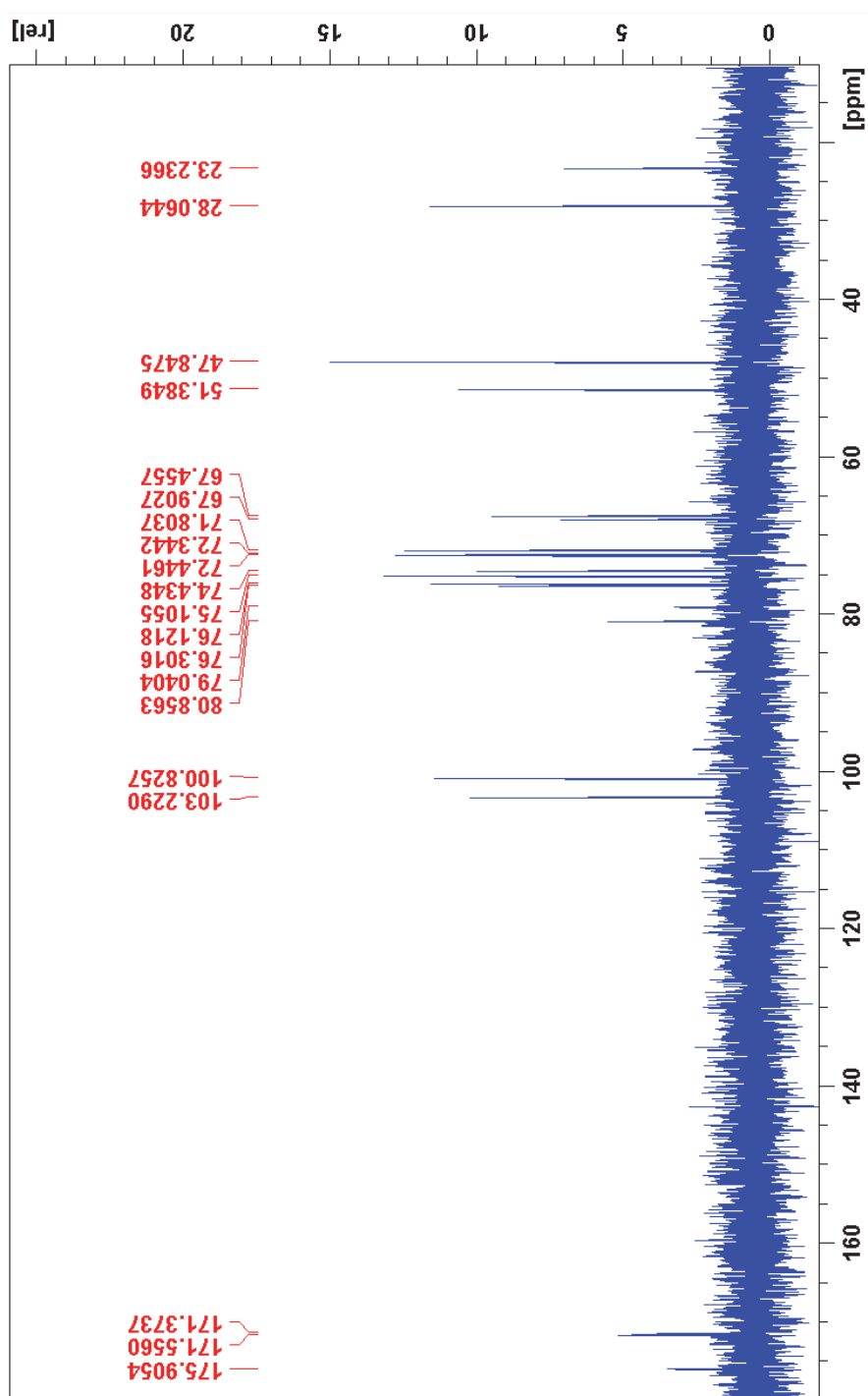
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



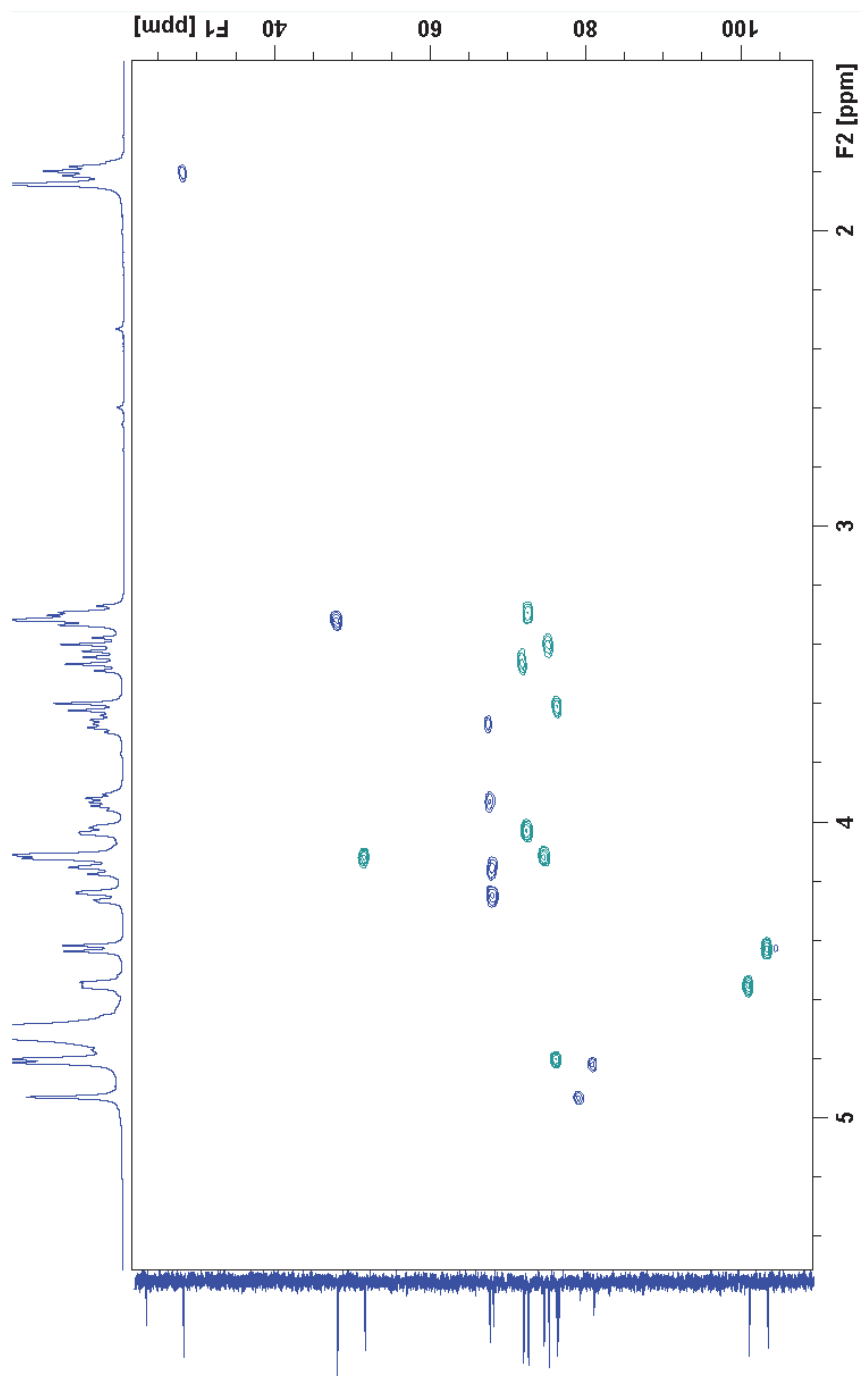
**Compuesto 41** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



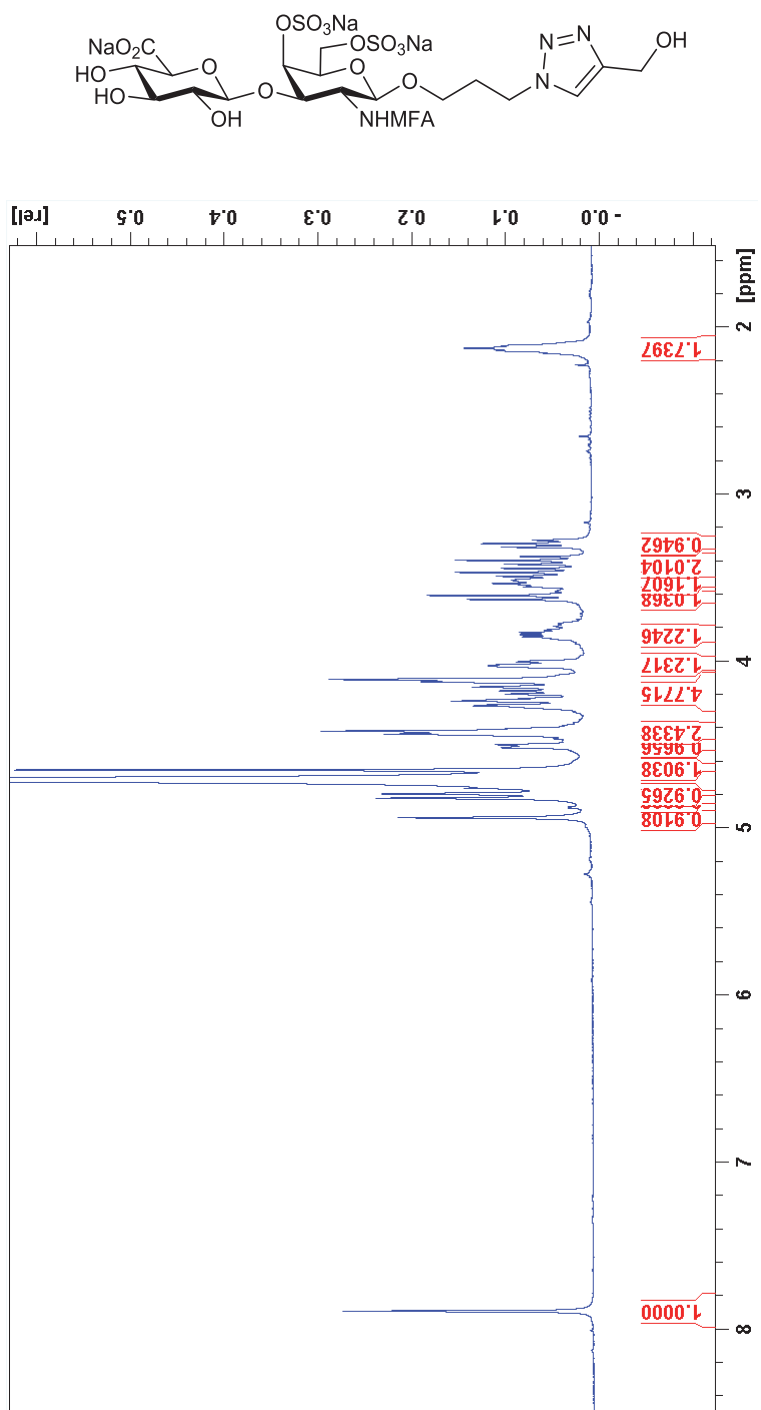
( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



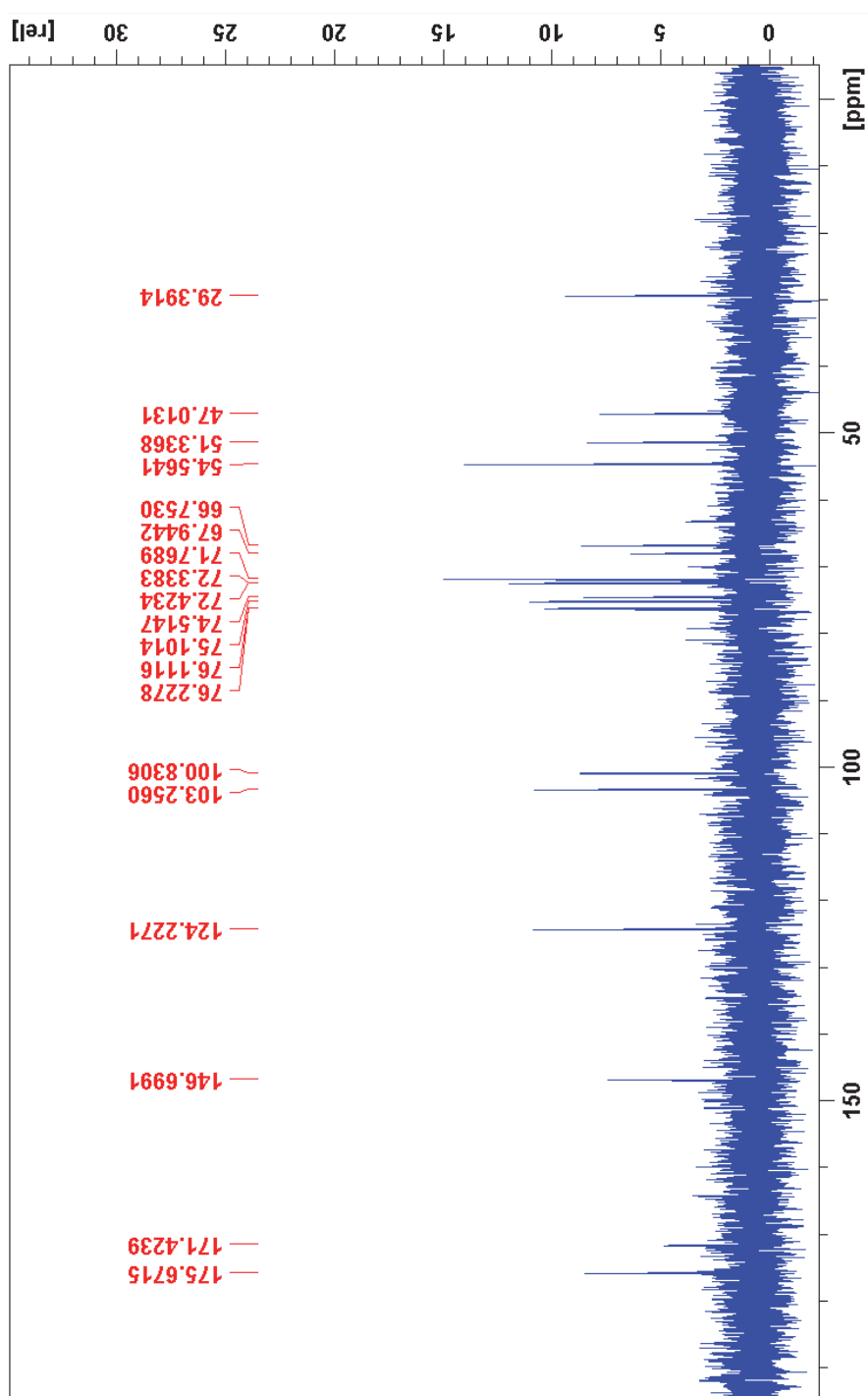
(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



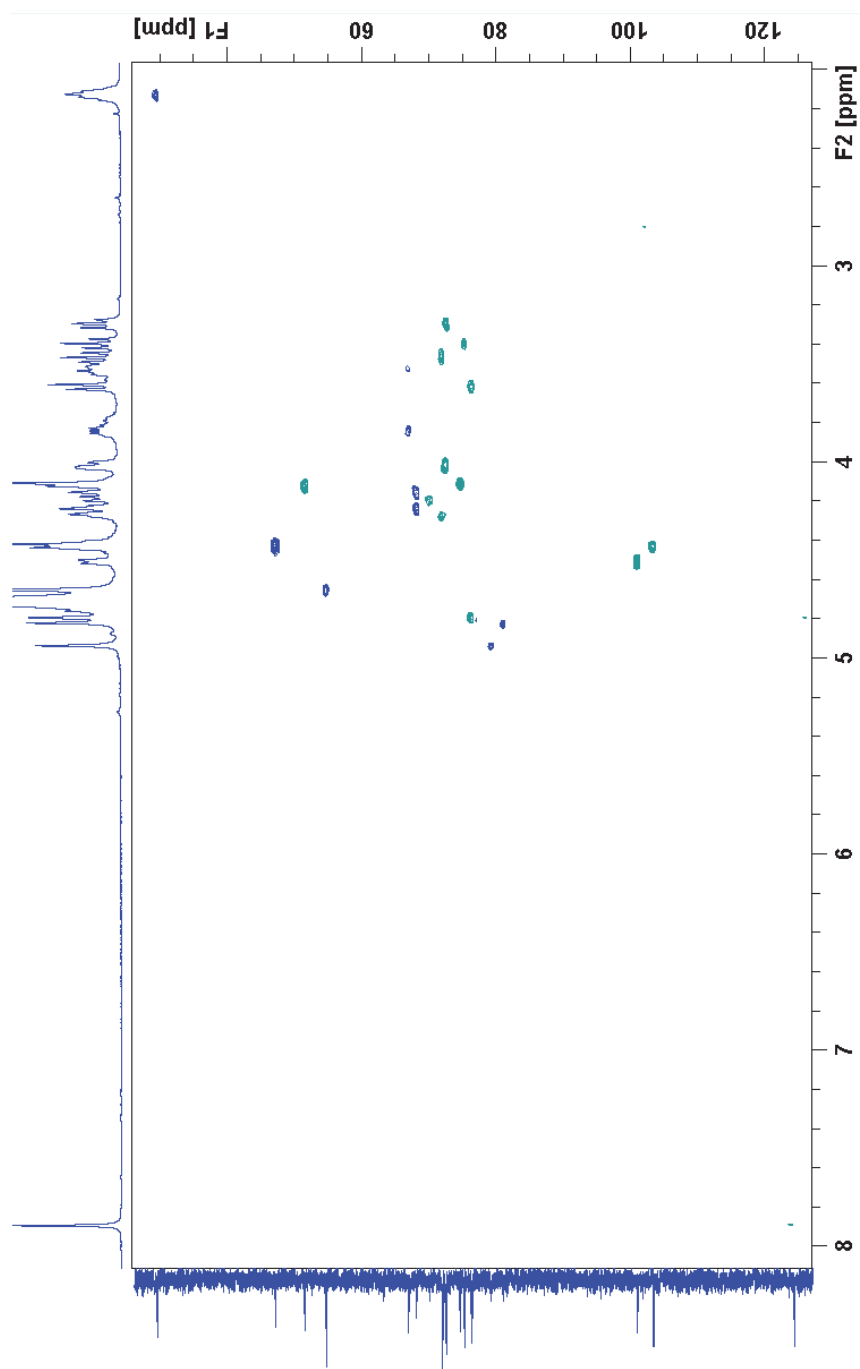
**Compuesto 42** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



( $^{13}\text{C}$ -RMN, 100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

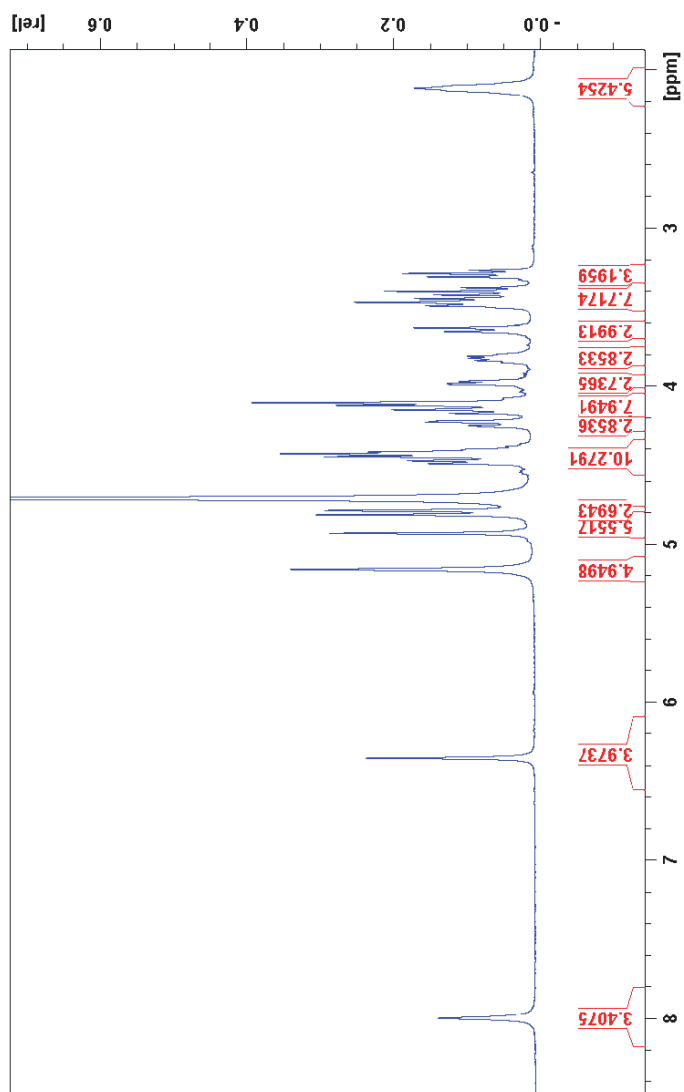
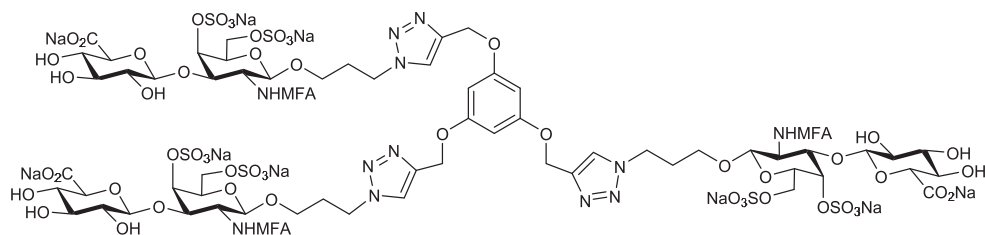


(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)

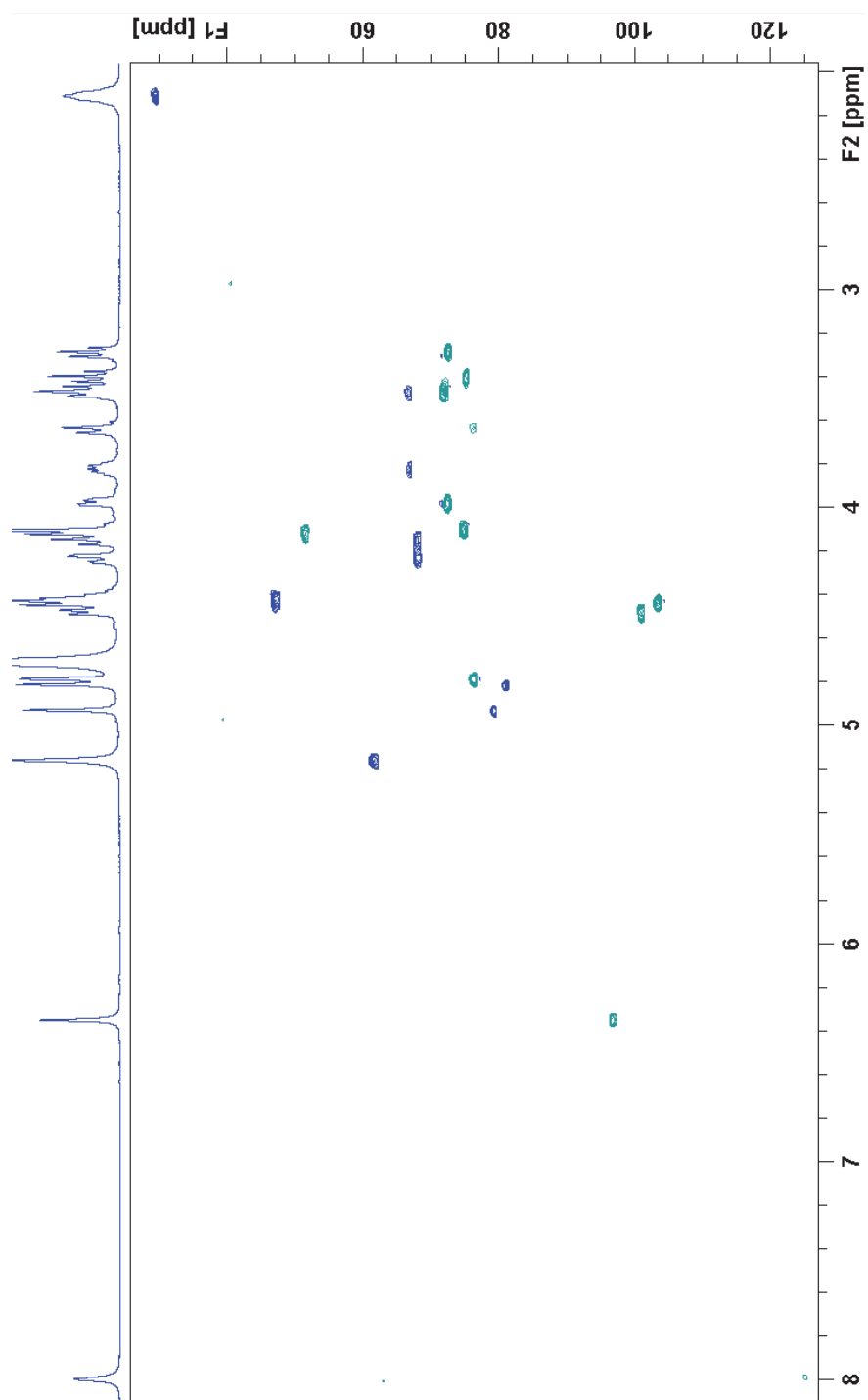




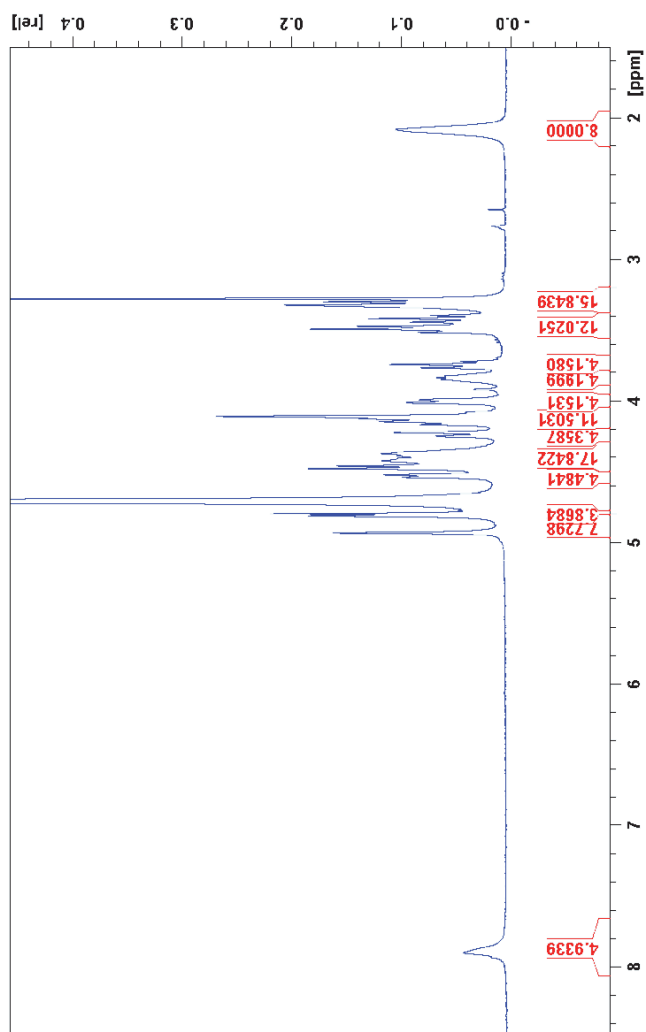
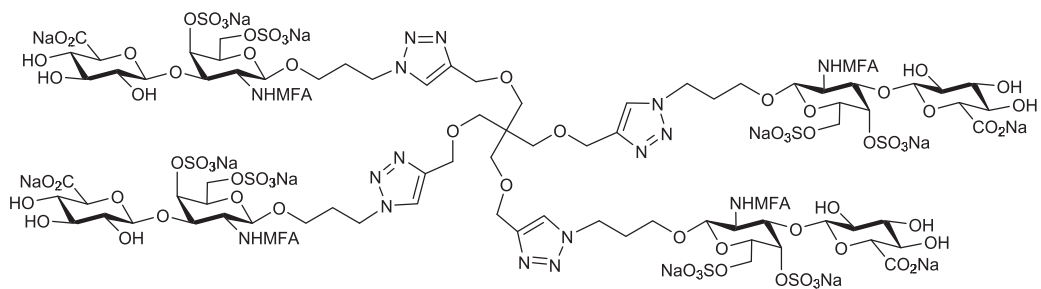
**Dendrímero 43** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)



**Dendrímero 44** ( $^1\text{H}$ -RMN, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )



(HSQC, 100 MHz, D<sub>2</sub>O)

